

餵飼不同芻料對荷蘭種泌乳末期牛隻瘤胃微生物 及乳成分之影響⁽¹⁾

王思涵⁽²⁾⁽³⁾ 廖曉涵⁽²⁾ 李佳馨⁽²⁾ 陳小明⁽²⁾ 蕭振文⁽²⁾

收件日期：112 年 8 月 9 日；接受日期：112 年 11 月 24 日

摘 要

本試驗旨在探究餵飼不同禾本科芻料，對荷蘭種泌乳末期乳牛瘤胃微生物及乳成分之影響。挑選產乳量及泌乳天數相近之泌乳牛共計 10 頭，逢機分為盤固草組（P 組）與百慕達組（B 組），每處理組 5 頭泌乳牛。試驗期為 21 天，試驗開始 0 – 18 天為適應期，第 19 天開始連續 3 天進行乳樣收集，並於試驗結束前採集瘤胃液。試驗結果指出，P 組與 B 組乳牛群瘤胃中分別具有 2,071 及 1,974 個獨特微生物物種去氧核糖核酸條碼存在。P 組與 B 組牛群瘤胃微生物均由 *Bacteroidetes*、*Firmicutes*、*Proteobacteria* 及 *Tenericutes* 四個優勢菌門主導。但優勢菌門在兩個處理組樣品相對豐富度有所不同，*Bacteroidetes* 作為第一優勢菌門在 P 組樣本中的相對豐富度為 69.81%，高於 B 組中 67.22%。P 組與 B 組牛群樣本中相對豐富度最高的屬為 *Prevotella*，占比分別為 49.45% 及 50.38%。以屬的級別進行主成分分析（principal component analysis, PCA）以評估處理組之間瘤胃微生物組成的差異，結果顯示 PC1 和 PC2 分別佔瘤胃微生物群組成變異為 22.16% 和 19.73%。在 PC1 變異貢獻度較高的主要細菌為 *Prevotella*，而 *Pseudobutyrvibrio*、*Kineothrix*、*Butyrvibrio* 及 *Alistipes* 則為 PC2 變異貢獻度較高的細菌。P 組與 B 組牛群其產乳量、乳脂肪率、乳蛋白質率、乳糖率、無脂固形物率、尿素氮及檸檬酸等間皆無顯著影響。但是，P 組牛群乳中新合成型脂肪酸（0.98 vs. 0.75 g/100 g of milk）含量顯著高於 B 組（ $p < 0.05$ ）。綜上試驗結果，荷蘭種泌乳末期乳牛群，餵飼不同芻料組成其瘤胃微生物組成相似，但比例不同，瞭解不同禾本科牧草完全混合日糧對泌乳牛群瘤胃核心微生物組成與乳成分變化，將有助於開發出瘤胃穩定且能發揮產能之國產芻料可能最適應用比例。

關鍵詞：完全混合日糧、瘤胃微生物、乳成分。

緒 言

國內酪農業牧草需求在 50 萬噸左右，其中國產牧草約 22 – 25 萬噸，占比為 50%，種類以熱帶牧草盤固草（*Digitaria decumbens*）、尼羅草（*Acroceras macrum*）、青割飼養的狼尾草（*Pennisetum alopecuroides*）與玉米（*Zea mays*）及玉米青貯為主；進口牧草量約 20 萬噸，占比為 40 – 50%，種類以苜蓿草（*Medicago*）、甜燕麥草（*Avena sativa*）、百慕達草（*Cynodon dactylon*）為主（行政院農業委員會農業統計年報，2021）。國產牧草受氣候限制，產季集中在夏天，春夏生長快速但秋冬生長遲緩甚至停滯，使得國產牧草夏季生產過剩，但冬季卻出現不足的現象。爰此，目前常見之方式為於牧草盛產時期調製乾草保存，俾於缺草時利用，但不同成熟度之盤固草，其營養分消化率隨成熟度增加而減少，利用國產牧草作為乳牛完全混合飼糧調配時，依照品質狀況評估使用比例會是穩定瘤胃微生物的關鍵之一。牛隻必須有高的採食量才能有好的產乳性能表現，但牛隻採食量容易受到產乳量、體重、泌乳階段、牧草纖維含量及氣候因素等影響，當夏季熱緊迫嚴重時，牛隻的採食量可能僅為涼季的 75% 或甚至更低，若飼糧選用牧草的中洗纖維（neutral detergent fiber, NDF）含量高，對於牛隻採食量的影響會更為明顯，如盤固草與狼尾草的 NDF 約為 70%，比苜蓿乾草的 45% 高很多，乳牛瘤胃微生物需要較長的分解時間，但瘤胃等消化道空間有限，因此牧草品質會影響牛隻的採食量（李，2010）。盤固草與百慕達草之粗蛋白質（crude protein, CP）與酸洗纖維（acid detergent fiber, ADF）含量分別為 5.9% 及 11.0% 與 42% 及 33.2%（乾基）。兩種草在瘤胃的可利用率差異不大，而除了 ADF 外，分解速度以百慕達草較快（李等，1999）。

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2772 號。

(2) 農業部畜產試驗所北區分所。

(3) 通訊作者，E-mail: shwang@mail.tlri.gov.tw

乳牛的瘤胃可視為一個厭氧發酵槽，瘤胃微生物具有分解纖維類原料的能力，透過瘤胃微生物對飼料原料的降解產生揮發性脂肪酸（volatile fatty acid, VFA），是提供乳牛能量與部分物質之營養前驅物。瘤胃微生物群是指聚集在瘤胃中高密度、多樣性廣且具複雜交互作用的微生物群包括細菌、古細菌、原生動物和真菌等，而細菌約占整體瘤胃微生物總量之 50 – 70%。瘤胃球菌屬（*Ruminococcus*）、丁酸弧菌屬（*Butyrivibrio*）、普氏菌屬（*Prevotella*）、纖維桿菌屬（*Fibrobacter*）、糞球菌屬（*Coprococcus*）及卞淋單胞菌屬（*Porphyromonas*）等幾個物種，是構成瘤胃微生物群的核心（楊，1997），其中普氏菌屬、丁酸弧菌屬和瘤胃球菌屬易受到飼糧組成變化影響（Henderson *et al.*, 2015）。瘤胃中細菌種類至少 7,000 種，乳牛瘤胃細菌以厚壁菌門（*Firmicutes*）及擬桿菌門（*Bacteroidetes*）為最主要的部份，上述兩者基因組序列分別占細菌類總體的 68 及 12.8%。以往微生物學家利用培養基的方式將瘤胃菌分離並培養，且僅 20% 瘤胃微生物可利用此技術培養（Krause *et al.*, 2013）。但近年來隨著分子生物技術進展使得瘤胃微生物的研究面向更廣，Wilkinson *et al.*（2018）利用 16S rRNA 基因擴增子定序進行微生物種類與組成研究，開啟以次世代定序技術（next-generation sequencing, NGS），進行各種環境體系微生物及瘤胃微生物菌群之研究可能性。

瘤胃中以厚壁菌門及擬桿菌門之微生物與乳脂肪產量最為相關（Jami *et al.*, 2014），但兩者的相對豐富度（relative abundance）是互補的，當厚壁菌門的相對豐富度提高時，則可觀察到擬桿菌門下降，此時乳脂肪產量上升。Bainbridge *et al.*（2016）研究指出，產乳量、乳蛋白質率及乳脂肪量與特定微生物族群有關，這也說明微生物會影響宿主生理條件。乳牛群性能改良計畫（dairy herd improvement, DHI）普遍利用傅立葉轉換紅外線光譜法（Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR）進行乳成分分析，如乳脂肪、乳蛋白質、乳糖及尿素氮等，這些資料除做為育種選留牛群之依據外，更廣泛地被酪農、營養師或獸醫師作為管理泌乳牛群健康之重要依據。隨著 FTIR 分析技術的進步，生乳中乳脂肪酸含量包括飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、短、中及長鏈脂肪酸等數據，這類相對複雜且非例行性檢測之乳成分數據，也已經開始出現在常規 DHI 檢測報告中（Gengler *et al.*, 2016）。本試驗旨在探究餵飼不同禾本科芻料對荷蘭種泌乳末期乳牛瘤胃微生物及乳成分之影響，期提供串聯芻料品質，瘤胃微生物變化及乳成分資料，搭配國產芻料營養成分找出可能最適應用比例。

材料與方法

本試驗於農業部畜產試驗所北區分所泌乳牛舍進行，試驗動物之使用、飼養管理及試驗內容經畜產試驗所北區分所實驗動物管理小組以畜試竹字 111-14 號申請核准在案。

I. 試驗動物飼養管理

本試驗期間為 2022 年 10 月至 12 月，使用荷蘭種（Holstein-Friesian）泌乳末期乳牛飼養於行政院農業委員會畜產試驗所北區分所，試驗期為 21 天。試驗開始 0 – 18 天為適應期，第 19 天開始連續採樣 3 天至試驗結束。試驗開始前，挑選產乳量及泌乳天數相近之泌乳牛共計 10 頭，逢機分為兩組，每處理組 5 頭泌乳牛。分為盤固草組（Pangola hay group, P 組）與百慕達組（Bermuda hay group, B 組）等兩組試驗牛群，資料分別為產乳量（ 28.7 ± 2.4 與 29.0 ± 2.6 kg）、泌乳天數（ 323 ± 45 與 330 ± 41 days），以同畜舍不同欄位分隔試驗牛群以利試驗進行。泌乳牛飼糧依據 NRC（2001）乳牛營養標準配製之完全混合日糧（total mix ration, TMR），組成包含百慕達草或盤固草、苜蓿乾草、大豆殼粒、玉米青貯、大豆粕與以玉米和大豆粕為主之精料，每日配製並餵飼兩次，分別於上午 5:00 配製 1/3 量並餵飼及下午 2:30 配製 2/3 量並餵飼，配製量的增減以隔天回收時有 5 – 10% 剩料為準，另以自動給水槽供應乾淨飲水及礦鹽任食。試驗使用之盤固草（A254 品系）為禾本科 *Digitaria* 屬多年生熱帶牧草，收穫來源為畜產試驗所北區分所牧草區，收割期為 2022 年 6 至 8 月，先以割草機切割後待其萎凋（65% 含水率），再以翻草機反覆進行翻草至含水率 10% 以下，最後以集草機與打包機進行收穫包裝；試驗使用之百慕達草來源為美國。本試驗使用之盤固草及百慕達草一般營養成分分析結果如表 1 所示，盤固草之 CP、粗脂肪（Ether extract, EE）、NDF 及 ADF 含量依序為 4.10%、1.17%、61.37% 及 34.19%；百慕達草之 CP、EE、NDF 及 ADF 含量依序為 9.39%、1.89%、58.10% 及 31.04%。

II. 乳成分檢測項目與方法

- (i) 產乳量及乳樣：每日擠乳兩次，分別為清晨 5:00 與下午 4:00，由乳量計紀錄個別牛隻產乳量，於試驗期第 19 天至第 21 天，連續 3 天採集個別牛隻上午及下午乳樣，混合個別牛各日上午下午乳樣後，送至畜產試驗所北區分所牛乳檢驗室分析一般乳成分。
- (ii) 生乳成分分析儀器：使用丹麥 FOSS 公司 MilkoScan™ FT+ 及 Fossomatic™ FC 進行生乳成分分析，項目包含乳脂肪率、乳粗蛋白質率、乳糖率、無脂固形物率、尿素氮、檸檬酸及乳脂肪酸組成等。並安裝 Fatty Acid

Origin 脂肪酸分析模組進行乳脂肪酸分析。

- (iii) Fatty Acid Origin 乳脂肪酸分析模組原廠定義：新合成型脂肪酸 (*de novo fatty acids*) 涵蓋範圍為 C4:0、C6:0、C8:0、C10:0、C12:0、C14:0 及 C14:1 脂肪酸；混合型脂肪酸 (*mixed fatty acids*) 涵蓋範圍為 C16:0 及 C16:1 脂肪酸；預製型脂肪酸 (*preformed fatty acids*) 涵蓋範圍為 C15:0、C17:0、C18:0、C18:1、C18:2、C18:3、C20:0、C20:2、C 22:0 及 C24:0 脂肪酸。

表 1. 盤固草與百慕達草之營養成分分析

Table 1. The analysis of Pangola hay and Bermuda hay

Items ¹	Pangola hay*	Bermuda hay*
Dry matter, %	91	94
CP, %	4.10	9.39
EE, %	1.17	1.89
NDF, %	61.37	58.10
ADF, %	34.19	31.04

* (% DM basis)

¹ CP = Crude protein; EE = Ether extract; NDF = neutral detergent fiber; ADF = Acid detergent fiber.

III. TMR 採樣及分析

於試驗期第 19 天至第 21 天，連續 3 天採集對照組與試驗組之 TMR，暫存於 -20°C，待均勻混合連續 4 天樣品後，以 55°C 烘乾 48 小時，熱秤得乾物質率後，依 AOAC (1990) 法進行乾物質、CP 及 EE 分析。依據 Van Soest *et al.* (1991) 方法分析 ADF 及 NDF。

IV. 瘤胃液採集與分析

- (i) 瘤胃液採集：兩組試驗牛群共計 10 頭皆於試驗期第 21 天進行瘤胃液採集，採集開始時間為上午 8:30，以口入瘤胃管 oral stomach tubing (OST) 搭配真空幫浦的技術採集。瘤胃管及抽吸探頭在使用前利用消毒水與清水處理後，靜置至乾燥後使用。荷蘭種泌乳牛成牛口入瘤胃管深入約 180 – 220 cm 後，即開啟真空幫浦進行瘤胃液抽吸，瘤胃液抽吸量約 250 mL，立即以 pH 檢測計 (WTW pH 3310 Germany) 測定瘤胃液 pH 值，隨後放置乾冰中保存，經前處理後取其中 50 mL 進行後續菌相分析。
- (ii) 瘤胃多源基因體萃取：利用商業化套組 (QIAamp PowerFecal DNA Kit, Qiagen) 進行瘤胃內容物中多源基因體 DNA 之萃取，DNA 濃度利用分光光度計 Qubit 4.0 Fluorometer (Thermo Scientific) 分析並調整為 1 ng/ul。
- (iii) 瘤胃細菌多樣性分析：全長 16S 基因 (V1-V9 區域) 由具 16S 基因專一性引子進行擴增，並依據 Pacbio 流程操作，及使用 SMRTbell 進行資料構建和測序。

V. 統計分析

試驗所得數值資料，使用 QIIME2 比對 MAFFT 與 NCBI 數據庫進行 ASVs 之間的序列相似性多重序列比對分析。二維散點圖用於可視化主成分分析 (principal component analysis, PCA) 得分向量，以評估試驗處理組間瘤胃微生物的相似性、趨勢和分組。利用 SAS 套裝軟體 (SAS, 2002)，計算使用不同處理組牛群之產乳量及乳成分平均數，並利用單因子變異數分析 (ANOVA) 比較組間的平均數差異，用 mean ± SD 表示，以 $\alpha = 0.05$ 為檢定顯著水準。

結果與討論

飼養乳牛第一要考慮的就是纖維的供應，纖維的充分採食有助於維持牛隻健康、微生物功能、泌乳性能及乳脂率。植物內含纖維素多寡會隨著其成熟度而逐漸增加，這也是影響動物乾物質採食量的最主要因素 (Buxton *et al.*, 1997)。豆科牧草如苜蓿草葉片及莖桿之 NDF 含量分別約為 25% 與 40 – 50%；而禾本科牧草如百慕達草葉片及莖桿之 NDF 含量則分別約為 50% 與 70% (Buxton *et al.*, 1995)。相較於豆科植物，反芻動物需要花較多咀嚼及反芻時

間將禾本科牧草的纖維磨碎，微生物附著於纖維顆粒表面分泌酵素降解纖維（McAllister *et al.*, 1994），小顆粒纖維相較於大顆粒的消化率來得快，因為小顆粒有較多的表面積暴露，有助於瘤胃微生物進行消化。芻料品質與瘤胃微生物附著或消化纖維的效率有關，直接或間接對反芻動物營養獲得造成影響。

表 2. 兩組試驗泌乳牛完全混合日糧之組成及營養成分

Table 2. Ingredients and nutrient composition of the total mixed ration for two groups of experimental lactating cows.

Ingredient items	Total mixed ration (% as DM basis) group ¹	
	P	B
Corn silage	22.96	22.90
Bermuda hay	-	12.96
Pangola hay	12.72	-
Alfalfa hay	14.38	14.34
Concentrate ²	29.31	29.23
Soybean hull	12.72	12.68
Soybean meal, 44% CP	5.33	5.32
Lipid ³	1.58	1.58
Sodium bicarbonate	0.80	0.80
Premix ⁴	0.20	0.20
Total	100	100
Calculated values (% as DM basis)		
DM, %	44	44
CP, %	16.4	17.2
EE, %	3.40	3.50
NDF, %	36.4	34.5
ADF, %	21.9	20.4
NEL ⁵ , Mcal/kg	1.52	1.52

¹ P = Pangola hay group; B =Bermuda hay group.

² Concentrate included ground rice (29.4%), ground corn (29.4%), soybean meal (28.5%), fish meal (3%), molasses (5%), salt (1.2%), limestone (1%), dicalcium potassium (0.8%), sodium bicarbonate (0.8%), magnesium oxide (0.4%), vitamin premix (0.03%), and mineral premix (0.02%). (as fed basis).

³ Lipid: Energy Booster 100® dry fat supplement contains 98% total fatty acids.

⁴ Each kilogram of premix contains Vit. A, 10,000,000 IU; Vit. D3, 1,600,000 IU; Vit. E, 70,000 IU; Fe, 50g; Cu, 10g; Zn, 40g; I, 0.5g; Se, 0.1g; Co, 0.1g.

⁵ NEL value is calculated according to NRC (2001).

李等（1991）曾分別以不同成熟度之盤固草作消化測定結果指出，盤固草的營養分消化率與總可消化營養分，均隨成熟度增加而減少。盤固草草高 50 – 70 公分收割者，全年可獲較佳乾物產量及品質較優之芻料，故適當時期採收可以得到最佳之攝取量、產量、成分與營養價值，為維持盤固草良好品質必須於適割時期收穫（卜等，1993）。黃等（2011）將全臺灣飼料成分分析結果盤點並彙集成冊內容指出，日曬盤固草（乾基）CP 含量介於 6.0 至 6.8%；EE 含量介於 1.8 至 2.0%；NDF 含量介於 73.9 至 74%；ADF 含量介於 43.3 至 44.3%。另外，日曬百慕達草（乾基）CP 含量約 10.9%；EE 含量約 2.1%；NDF 含量約 69.9%；ADF 含量約 33.9%。整體而言，盤固草與百慕達草雖同為禾本科牧草，但就營養成分而言百慕達草之 CP 及 EE 含量較盤固草高。本試驗使用之盤固草或百慕達草 CP、EE、NDF 及 ADF 皆低於上述結果，可能的原因為氣候變遷影響國產及進口牧草品質。以國內而言，2020 至 2021 年出現無颱風且連續乾旱及高溫，使得畜產試驗所北區分所 2022 年盤固草雖於適割期收穫，卻由於前幾年無法配合天候施肥導致牧草生長不如往年。本試驗期間採集之 TMR 營養成分計算結果如表 2 所示，盤固草 TMR 之 CP、EE、NDF 及 ADF 含量依序為 16.4%、3.4%、36.4% 及 21.9%；百慕達草 TMR 之 CP、EE、NDF 及 ADF 含量依序為 17.2%、3.5%、34.5% 及 20.4%。不同種類禾本科牧草，雖可藉由配方計算將兩個處理組 TMR 之 CP 與 EE 符合泌乳牛需求，但 NDF 與 ADF 的含量仍略有差異。乳牛乾物質採食量的主要影響因子為 NDF 而影響消化率的主要飼糧因子為 ADF（李等，1999）。同時，分所收穫之盤固草以圓捆包方式打包，需在加入 TMR 前先切短至 10 到 15 公分長度，但仍無法十分

均勻；而百慕達草則直接在調製 TMR 時直接混入 TMR 中攪拌。雖然，盤固草與百慕達草品質及調製過程，皆有可能會造成牛群採食量及消化過程中的差異，本研究探討不同芻料對瘤胃微生物及乳成分之影響，初步推論當盤固草品質偏低且占比不高的情形下具有差異。

一般而言，瘤胃中的 pH 值約為 6 – 7，但會因飼糧組成變化而造成微生物菌群消長與揮發性脂肪酸組成之變化。瘤胃中的丙酸及丁酸可透過腸壁吸收做為反芻動物的能量來源，反芻動物唾液中含大量的碳酸氫鈉、碳酸氫鉀和尿素，可有助於瘤胃 pH 值之穩定，同時發酵過程中產生的氨也有利於微生物生長（宋，2006）。本試驗 P 組及 B 組牛群之瘤胃 pH 值平均分別 6.71 (n= 4) 與 6.82 (n= 5)，說明兩組試驗牛群瘤胃狀態穩定。近年來，許多研究報告建議捨棄操作分類單元 (operational taxonomic units, OTU) 的分類方式，轉而採用去噪 (Denoising) 方法，獲得解析度更高的擴增子序列變體 (amplicon sequence variants, ASVs) (Knight *et al.*, 2018)，因此，本試驗結果以校正擴增子序列錯誤的演算模型 (divisive amplicon denoising algorithm, DADA) (Rosen *et al.*, 2012)。P 組與 B 組乳牛群瘤胃中分別具有 2,071 及 1,974 個獨特微生物物種去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 條碼，存在與不同處理組間 (如圖 1)，此結果說明不同芻料組成之 TMR 可能會造成荷蘭種泌乳末期乳牛瘤胃微生物組成之差異。Roques *et al.* (2023) 研究報告指出，透過 ASVs 來表示瘤胃微生物群的豐富和多樣性，以了解不同飼糧組成對瘤胃微生物群造成之差異。試驗結果指出，與飼餵晚割青貯 (late mown silage diet, LMS) 飼糧之乳牛相比，飼餵一般青貯 (control silage diet, CS) 飼糧的乳牛在 820 個 DNA 條碼中有 547 個在兩組間具有顯著差異。其中，瘤胃球菌科和琥珀弧菌科 (*Succinivibrionaceae* families) 含量在 LMS 組的乳牛瘤胃中顯著低於 CS 組 ($p < 0.001$)；相反，LMS 組乳牛瘤胃中克里斯滕氏菌 (*Christensenellaceae* families) 含量明顯較高 CS 組 ($p < 0.001$)。另外，與飼餵高草本植物青貯 (herb rich silage diet, HRS) 的乳牛相比，LMS 組的乳牛在 820 個 DNA 條碼中有 347 個在兩組間具有顯著差異，HRS 組的乳牛瘤胃之變形菌門 (*Proteobacteria*) 含量明顯比 LMS 組的乳牛更豐富 ($p = 0.03$)。上述試驗與本試驗相似皆說明瘤胃微生物群的組成會受到飼糧之強烈影響。

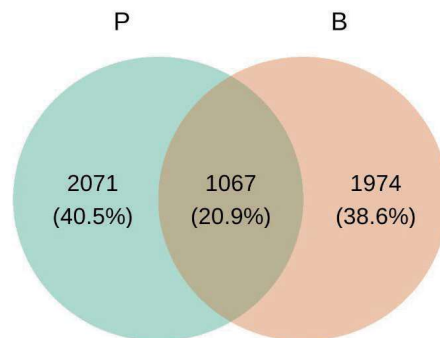


圖 1. 飼餵不同芻料組成完全混合日糧，對荷蘭種泌乳末期乳牛瘤胃微生物之影響。兩個橢圓代表兩個處理組，重疊區域代表盤固草組 (P) 與百慕達組 (B) 之間相同的子序列變體量。

Fig. 1. Effect of different grasses TMR for rumen microbiota of Holstein late lactation milking cows. Each ellipse represents one group. The overlapping regions between the ellipses represent as the amplicon sequence variants (ASVs) that are shared between the Pangola hay group (P) and Bermuda hay group (B).

瘤胃內細菌的總數與各細菌族群多寡，皆會受飼料來源而改變，例如當飼料中精料含量多，則會使乳酸桿菌的數目增加。乳牛採食牧草並分解纖維素作為營養來源，瘤胃微生物具備降解植物纖維素及半纖維素的能力 (Koike and Kobayashi, 2009)，而影響瘤胃微生物降解的能力包括牧草種類、作物成熟度及微生物族群多寡 (Castillo-Gonzalez *et al.*, 2014)。由圖 2 可知，P 組與 B 組牛群瘤胃微生物均由擬桿菌門 (*Bacteroidetes*)、厚壁菌門 (*Firmicutes*)、變形菌門及軟壁菌門 (*Tenericutes*) 四個優勢菌門主導。各優勢菌門在兩個處理組樣品相對豐富度也有所不同，擬桿菌門作為第一優勢菌門在 P 組樣本中的相對豐富度為 69.81%，高於 B 組中 67.22%；而第二優勢菌門的厚壁菌門在 P 組樣本中為 18.61%，低於 B 組中 22.92%。健康牛群瘤胃微生物群在門的級別，大部分屬於擬桿菌門及厚壁菌門 (De Oliverira *et al.*, 2013)。由圖 3 可知，P 組與 B 組牛群瘤胃微生物樣本中，相對豐富度最高的屬為普氏菌屬，P 組與 B 組牛群樣本中普氏菌屬占比分別為 49.45% 及 50.38%。普氏菌屬、瘤胃球菌屬和丁酸弧菌屬在泌乳牛的瘤胃中含量最豐富，也是乾乳早期的優勢菌屬 (Xue *et al.*, 2018)。普氏菌屬為主要利用非結構性碳水化合物化合物的細菌品種，也是瘤胃中數目最多的細菌。這類細菌具有分解大分子非結構性碳水化合物 (如澱粉) 的酵素，但卻沒有分解植物纖維的酵素，不過仍可利用纖維的分解產物，如水溶性纖維寡糖、纖維二糖及葡萄糖。同時，這類細菌偏好胺基酸和胜肽作為細胞內蛋白質合成所需氮源，對酸度容忍度較高，即使 pH 值低於 5 仍可存活。Henderson *et al.* (2015) 研究指出普氏菌屬、丁酸弧菌屬和瘤胃球菌屬易受到飼糧組成變化影響，說明 P 組與 B 組牛群樣本中普氏菌屬占比些許差異的

可能原因。Xue *et al.* (2018) 為了解不同泌乳天數對牛群瘤胃中 VFA 含量影響，將泌乳天數自 90 天至 219 天分成四個組，結果發現不同泌乳天數區間其牛群瘤胃中 VFA 含量具有顯著差異 ($p < 0.01$)，此結果也說明不同泌乳階段之牛群瘤胃微生物群具有差異。本試驗兩組選用牛群泌乳天數平均皆大於 305 天屬泌乳末期，其瘤胃微生物群結果比較應無受泌乳天數影響。另外，利用 PCA 分析，了解餵飼不同芻料組成 TMR 對荷蘭種泌乳末期牛瘤胃主要微生物組成豐富度差異之影響如圖 4 所示，以屬的級別進行 PCA 以評估處理組之間瘤胃微生物組成的差異。PCA 圖顯示，PC1 和 PC2 分別佔瘤胃微生物群組成變異為 22.16% 和 19.73%，在 PC1 變異貢獻度較高的主要細菌為 *Prevotella*，而 *Pseudobutyrvibrio*、*Kineothrix*、*Butyrvibrio* 及 *Alistipes* 則為 PC2 變異貢獻度較高的細菌。綜上，本試驗結果說明荷蘭種泌乳末期乳牛群在不同芻料組成餵飼下其瘤胃微生物組成相似，但比例不同。

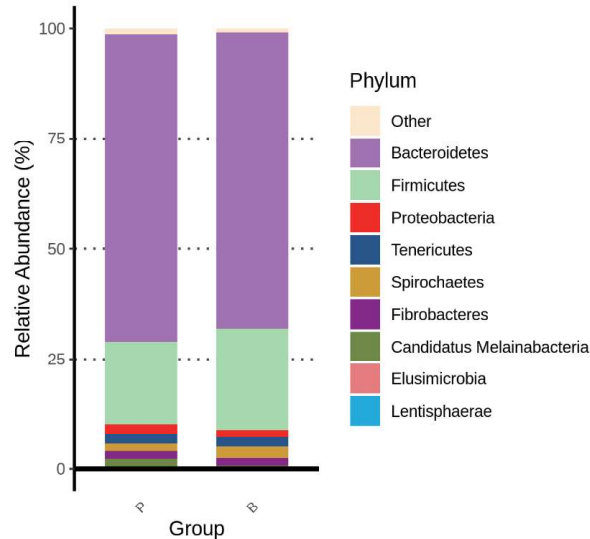


圖 2. 餵飼不同芻料組成完全混合日糧，對荷蘭種泌乳末期乳牛瘤胃微生物組成在門級別豐富度差異之影響。

Fig. 2. Effect of different grasses TMR for major rumen microbiota at the phylum level relative abundance of late lactation Holstein milking cows.

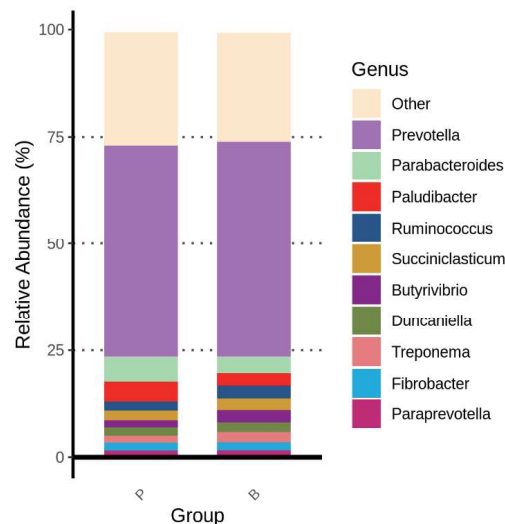


圖 3. 餵飼不同芻料組成完全混合日糧，對荷蘭種泌乳末期乳牛瘤胃微生物在屬級別豐富度差異之影響。

Fig. 3. Effect of different grasses TMR for major rumen microbiota at the genus level relative abundance of late lactation Holstein milking cows.

表 3 為餵飼不同芻料組成 TMR 對荷蘭種泌乳末期乳牛產乳量及乳成分影響之結果，P 組與 B 組牛群其產乳量 (29.58 vs. 28.28 kg)、乳脂肪率 (4.14 vs. 3.55%)、乳蛋白質率 (3.24 vs. 3.48%)、乳糖率 (4.72 vs. 4.91%)、無脂固形物率 (8.67 vs. 9.01%)、尿素氮 (13.78 vs. 14.53 mg/dL) 及檸檬酸 (155 vs. 141 mg/dL) 等間皆無顯著影響。乳脂肪率、乳蛋白質率與灰分會隨泌乳期之泌乳天數之增加而增加，但乳糖卻稍減 (宋, 2006)。P 組及 B 組試驗牛群之平均起始泌乳天數，分別為 323 ± 45 及 330 ± 41 天，皆屬於泌乳末期，試驗選用泌乳末期牛群進行可能

是造成本試驗處理組與對照組產乳量與乳品質間無顯著差異之原因。Jami *et al.* (2014) 研究指出，瘤胃中以厚壁菌門及擬桿菌門之微生物與乳脂肪產量最為相關，且兩者的相對豐富度 (relative abundance) 是互補的，當厚壁菌門的相對豐富度提高時，可觀察到擬桿菌門下降，則此時乳脂肪產量上升。前述研究結果與本試驗結果相異，B 組厚壁菌門在占比高於 P 組，但 B 組乳脂肪率結果並未高於 P 組，主要的差異為本試驗使用之 TMR 組成芻精料比的原因，Jami *et al.* (2014) 試驗飼糧之芻精料比為 30 : 70。影響牛乳脂肪酸組成之因素很多，主要可分成動物、飼料和環境因素。動物因素包括牛隻品種、胎次和泌乳階段等；環境因素如季節、牛群管理及擠乳頻率等；飼料因素則以飼料與草料種類為主 (Jensen, 2002)。表 4 為餵飼不同芻料組成 TMR 對荷蘭種泌乳末期乳牛乳脂肪酸組成影響之結果，P 組與 B 組牛群其總飽和脂肪酸 (2.9 vs. 2.27 g/100 g of milk)、總不飽和脂肪酸 (1.01 vs. 0.98 g/100 g of milk)、混合型脂肪酸 (1.55 vs. 1.33 g/100 g of milk) 及預製型脂肪酸 (1.36 vs. 1.23 g/100 g of milk) 無顯著影響。但 P 組牛群其乳中新合成型脂肪酸 (0.98 vs. 0.75 g/100 g of milk) 含量顯著高於 B 組 ($p < 0.05$)。乳腺在合成脂肪時，所需要的脂肪酸來源主要可分為兩類，第一種是乳腺用來自瘤胃發酵產生之乙酸 (acetic acid) 及 β - 羥基丁酸 (β -hydroxybutyrate) 自行合成脂肪酸，乳脂中所有含十個碳數以下脂肪酸皆由此而來。第二種是乳腺吸收血液中現成的脂肪酸，主要來自食物和身體其他組織製造，少部分來自於瘤胃微生物合成，含乳脂中含十個至十六個碳數的脂肪酸約有一半在乳腺中合成，另一半來自血脂。若脂肪酸來源受到限制，乳脂的生成便會減少。本試驗結果顯示，兩個處理組在乳脂肪率的部分並無顯著差異，但 P 組與 B 組牛群乳脂中的新合成型脂肪酸卻有顯著差異 ($p < 0.05$)，說明乳腺利用來自瘤胃發酵產生之乙酸及 β - 羥基丁酸來源，可能受到不同芻料組成 TMR 影響，但須進一步評估瘤胃發酵產物變化才能釐清。

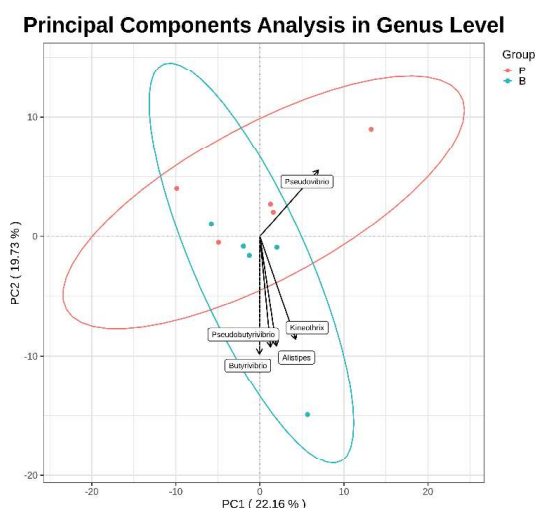


圖 4. 不同芻料組成完全混合日糧對荷蘭種泌乳末期乳牛瘤胃微生物在屬級別豐富度差異之主成分分析結果。

Fig. 4. Principal component analysis (PCA) plots of rumen bacterial communities between Pangola hay group (P) or Bermuda hay group (B) TMR.

表 3. 餵飼不同芻料組成完全混合日糧，對荷蘭種泌乳末期乳牛產乳量及乳成分之影響

Table 3. Effect of different grasses TMR for milk composition of Holstein late lactation milking cows.

Item	Groups ¹		p-value
	P (n ² = 5)	B (n = 5)	
Milk yield, kg/d	29.58 ± 2.90	28.28 ± 2.46	0.59
Milk composition			
Fat, %	4.14 ± 1.55	3.55 ± 0.31	0.07
Crude protein, %	3.24 ± 0.30	3.48 ± 0.35	0.95
Lactose, %	4.72 ± 0.23	4.91 ± 0.54	0.08
Solid not-fat, %	8.67 ± 0.42	9.01 ± 0.34	0.63
Urea nitrogen, mg/dL	13.78 ± 2.04	14.53 ± 4.16	0.30
Citric acid, mg/dL	155 ± 21	141 ± 27	0.76

Mean ± standard deviation.

¹ P = Pangola hay group; B = hay group.

² n = number of cows.

表 4. 餵飼不同芻料組成完全混合日糧，對荷蘭種泌乳末期牛乳脂肪酸組成之影響

Table 4. Effect of different grasses TMR for milk fatty acids composition of Holstein late lactation milking cows.

Item	Groups ¹		p-value
	P (n ² = 5)	B (n = 5)	
Total saturated fatty acid, %	2.90 ± 1.30	2.27 ± 0.23	0.06
Total unsaturated fatty acid, %	1.01 ± 0.30	0.98 ± 0.13	0.33
De novo fatty acid ³ , %	0.98 ± 0.44	0.75 ± 0.06	<0.05
Mixed fatty acid, %	1.55 ± 0.57	1.33 ± 0.10	0.06
Preformed fatty acid, %	1.36 ± 0.44	1.23 ± 0.15	0.20

Mean ± standard deviation.

¹ P = Pangola hay group; B= Bermuda hay group.

² n = number of cows.

³ De novo fatty acid (C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0 and C14:1), mixed fatty acid (C16 and C16:1), preformed fatty acid (C15:0, C17:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:0, C20:2, C 22:0 and C24:0).

結 論

荷蘭種泌乳末期乳牛，餵飼不同禾本科牧草完全混合日糧，會造成其瘤胃微生物組成及乳成分變化。P 組與 B 組牛群瘤胃微生物均由 *Bacteroidetes*、*Firmicutes*、*Proteobacteria* 及 *Tenericutes* 四個優勢菌門主導；P 組與 B 組牛群樣本中，相對豐富度最高的屬為 *Prevotella*，占比分別為 49.45% 及 50.38%；以屬的級別進行 PCA 以評估處理組之間瘤胃微生物組成的差異，結果顯示 PC1 和 PC2 分別佔瘤胃微生物群組成變異為 22.16% 和 19.73%。P 組與 B 組牛群其產乳量、乳脂肪率、乳蛋白質率、乳糖率、無脂固形物率、尿素氮及檸檬酸等間皆無顯著影響。但是，P 組牛群其乳中新合成型脂肪酸 (0.98 vs. 0.75 g/100 g of milk) 含量顯著高於 B 組 ($p < 0.05$)。綜上試驗結果，荷蘭種泌乳末期乳牛群在不同芻料組成餵飼下其瘤胃微生物組成相似，但比例不同。可能由於飼糧造成瘤胃微生物組成差異，也使得乳脂肪中與瘤胃發酵有關之新合成型脂肪酸比例在兩組間有顯著差異。瞭解不同禾本科牧草完全混合日糧對泌乳牛群瘤胃核心微生物組成與乳成分變化，將有助於找出國產芻料可能最適應用比例。

誌 謝

試驗期間感謝畜產試驗所北區分所乳牛科技系現場工作同仁，協助試驗牛群飼養管理及樣本收集。

參考文獻

行政院農業委員會農業統計年報。2021。110 年農業生產之牧草。

<https://agrstat.coa.gov.tw/sdweb/public/book/Book.aspx>.

卜瑞雄、施意敏、陳吉斌、陳茂墻。1993。不同割期對盤固草產量、化學成分與營養價值之影響。中畜會誌 22:373-386。

李春芳、卜瑞雄、施意敏、陳茂墻。1991。盤固草 A254 (*Digitaria decumbens*, A254) 不同生長期之營養價值。畜產研究 24:59-65。

李春芳、陳吉斌、蕭宗法。1999。盤固草與百慕達草對荷蘭種泌乳牛飼養價值比較。畜產研究 32:353-364。

宋永義。2006。新編乳牛學。華香園出版社。臺北市。

李春芳。2010。反芻動物 (乳牛、肉牛)。畜牧要覽飼養與營養篇。華香園。臺北市。

黃英豪、李春芳、廖宗文、李免蓮、余碧、沈添富、林俊臣、姜樹興、洪平、徐濟泰、許振忠、許福星、盧金鎮、顏宏達、施柏齡、劉芳爵、范耕榛、王仁得。2011。臺灣飼料成分手冊。行政院農業委員會畜產試驗所專輯第 147 號。臺灣。

楊价民。1997。瘤胃生態系統與反芻動物對養分的利用。藝軒圖書出版社。臺北市。

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists International). 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Arlington, VA. USA.
- Bainbridge, M. L., L. M. Cersosimo, A. D. G. Wright, and J. Kraft. 2016. Rumen bacterial communities shift across a lactation in Holstein, Jersey and Holstein × Jersey dairy cows and correlate to rumen function, bacterial fatty acid composition and production parameters. *FEMS Microbiol Ecol.* 92(5):1-14.
- Buxton, D. R., D. R. Mertens, and K. J. Moore 1995. Forage quality for ruminants: plant and animal considerations. *Prof. Anim. Sci.* 11: 121-131.
- Buxton, D. R. and D. D. Redfearn. 1997. Plant limitations to fiber digestion and utilization. *The J. Nutr.* 127. 814S-818S.
- Castillo-Gonzalez, A. R., M. E. Burrola-Barraza, J. Dominguez-Viveros, and A. Chavez-Martinez. 2014. Rumen microorganisms and fermentation. *Microorganisms fermentation ruminal. Arch. Med. Vet.* 46:349-361.
- De Oliveira, M. N. V., K. A. Jewell, F. S. Freitas, L. A. Benjamin, M. R. Tótola, A. C. Borges, C. A. Moraes, and G. Suen. 2013. Characterizing the microbiota across the gastrointestinal tract of a Brazilian Nelore steer. *Vet. Microbiol.* 164: 307-314.
- Gengler, N., H. Soyeurt, F. Dehareng C. Bastin, F. Colinet, H. Hammami, M.-L. Vanrobays, A. Lainé, S. Vanderick, C. Grelet, A. Vanlierde, E. Froidmont, and P. Dardenne. 2016. Capitalizing on fine milk composition for breeding and management of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:4071-4079.
- Henderson, G., F. Cox, S. Ganesh, A. Jonker, W. Young, and P. H. Janssen. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. *Sci. Rep.* 5: 14567.
- Jensen, R. G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.* 85:295-350.
- Jami, E. B., A. White, and I. Mizrahi. 2014. Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. *PLoS One.* 9:1.
- Koike, S. and Y. Kobayashi, 2009. Fibrolytic rumen bacteria: their ecology and functions. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 22:131-138.
- Krause D.O., T. G. Nagaraja, A. D. G. Wright, and T. R. Callaway. 2013. Rumen microbiology: leading the way in microbial ecology. *J. Anim. Sci.* 91:331-341.
- Knight, R., A. Vrbanac, B. C. Taylor, A. Aksenov, C. Callewaert, and J. Debelius. 2018. Best practices for analysing microbiomes. *Nat Rev Microbiol.* 1 Nature Publishing Group.
- 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.
- NRC (National Research Council). 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. National Academies Press, Washington, DC. USA. 5: 43-85.
- Rosen, M.J., B. J. Callahan, D. S. Fisher, and S. P. Holmes. 2012. Denoising PCR-amplified metagenome data. *BMC Bioinf.* 13:283.
- Roques, S., L. Koning, J. van Riel, A. Bossers, D. Schokker, S. Kanti Kar, and L. Sebek. 2023. Influence of agroecology practices on rumen microbiota associated with methane emission in dairy cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 303:115716.
- SAS. 2002. SAS User's guide: Basics, 2002 edition. SAS institute Inc., Cary, NC.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74 : 3583-3597.
- Wilkinson T. J., S. A. Huws, J. E. Edwards, A. H. Kingston-Smith, K. Sui-Ting, M. Hughes, F. Rubino, M. Friedersdorff, and C. J. Creevey. 2018. CowPI: a rumen microbiome focused version of the PICRUST functional inference software. *Front. Microbiol.* 9:1095.
- Xue, M.; H. Sun, X. Wu, L. L. Guan, and J. Liu. 2018. Assessment of rumen microbiota from a large dairy cattle cohort reveals the pan and core bacteriomes contributing to varied phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 84: 00970-18.

The effect of different forage on rumen microbiota and milk composition of Holstein late lactation milking cows ⁽¹⁾

Szu-Han Wang⁽²⁾⁽³⁾ Hsiao-Han Liao⁽²⁾ Chia-Xin Lee⁽²⁾ Hsiao-Ming Chen⁽²⁾
and Jen-Wen Shiau⁽²⁾

Received: Aug. 9, 2023; Accepted: Nov. 24, 2023

Abstract

The objective of this was to compare the milking cow's microbiota profiles and milk composition by feeding different forage total mix rations. A total of 10 late lactation milking cows with similar milk production and lactation days were selected, and five lactating cows were in each Pangola hay (P) or Bermuda hay (B) group. In the experimental period, cows were pre-fed for 18 days. Milk samples were collected in the last three days, and rumen fluid samples were only collected at the end of the experimental period. The results showed 2,071 and 1,974 DNA barcoding of unique microbial species in the rumen of dairy cows in groups P and B, respectively, and between different treatment groups. At the phylum level, the rumen microorganisms of the P and B groups were dominated by four dominant bacteria, including *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, and *Tenericutes*. Nevertheless, the relative abundance of the dominant phylum in the samples of the two treatment groups was different. The relative abundance of Bacteroides as the first dominant phylum in the samples of group P was 69.81%, which was higher than that of 67.22% in group B. The genus with the highest relative abundance in group P and B cattle samples was *Prevotella*, accounting for 49.45% and 50.38%, respectively. PCA analysis indicated that *Prevotella* was the major bacteria with higher contributions to variability, *Pseudobutyrvibrio*, *Kineothrix*, *Butyrvibrio*, and *Alistipes* were major contributors to PC2 variability. No significant differences existed between groups P and B of milk yield, fat, protein, lactose, solids not-fat, urea nitrogen, and citric acid content. However, the content of *de novo* fatty acids (0.98 vs. 0.75 g/100 g of milk) in the milk of group P was significantly higher than that of group B ($p < 0.05$). To summarize the results, the composition of rumen microbiota in milking cows fed with different ration compositions was similar, but the proportions differed. Understanding the changes in rumen core microbial composition and milk composition of milking cows with different forage complete mixed diets will help to develop the most suitable ratio of domestic forage that is stable in the rumen and capable of utilizing production capacity.

(1) Contribution No. 2772 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA)

(2) Northern Region Branch, MOA-TLRI, Miaoli 36843, Taiwan, R. O. C.

(3) Corresponding author, E-mail: shwang@mail.tlri.gov.tw.