การคัดแยกเชื้อและความหลากหลายของแบคทีเรียกรดแลคติกในพืชอาหารสัตว์หมัก

Isolation and Diversity of Lactic Acid Bacteria in Silages

สุขเกษม คงสันต์ (Sukkasame Kongsan)*, ** ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์ (Dr.Kanya Jirajaroenrat)***
วิชัย ศุภลักษณ์ (Wichai Suphalucksana)****

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการคัดแยกเชื้อรวมทั้งศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกในพืชอาหารสัตว์หมัก จำนวน 5 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 หญ้ากินนีสีม่วง 100% สูตรที่ 2 กระถิน 100% สูตรที่ 3 ต้นถั่วลิสง 100% สูตรที่ 4 หญ้ากินนีสีม่วง 60% ผสมกระถิน 40% และสูตรที่ 5 หญ้ากินนีสีม่วง 60% ผสมต้นถั่วลิสง 40% หมักอาหารทุกสูตรเป็นเวลา 21 วัน นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก จากการศึกษาพบว่า ปริมาณของเชื้อโดยเฉลี่ยในพืชอาหารสัตว์หมักทั้ง 5 สูตร มีอยู่ในช่วง 10^6-10^7 โคโลนีต่อกรัม เมื่อเลือกเก็บไอโซเลทของเชื้อตามลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่แตกต่างกันได้ทั้งสิ้น 282 ไอโซเลท สามารถแบ่งออกได้ 4 สกุล ได้แก่ *Lactobacillus* sp. ซึ่งมีปริมาณสูงในทั้ง 5 สูตรอาหาร *Leuconostoc* sp. พบเฉพาะในสูตรที่ 2 และ 4 ขณะที่ *Pediococcus* sp. และ *Streptococcus* sp. พบเฉพาะในสูตรที่ 1 และ 5 และเมื่อจำแนกเชื้อตามลักษณะทางกายภาพและการเจริญในสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ต่างกัน พบว่า สามารถแบ่งเชื้อได้ 20 กลุ่ม (A-T) โดยกลุ่ม L, N และ O เป็นกลุ่มที่พบจำนวนไอโซเลทมากที่สุด 30-40 ไอโซเลท ตัวอย่างทั้งหมดจะได้นำไปจำแนกสปีชีย์โดยวิธีทางชีวโมเลกุลต่อไป

ABSTRACT

The purpose of this study was to isolate and obtain the information on the diversity of lactic acid bacteria (LAB) in 5 different silage formulas including F1 (100% guinea grass *Panicum maximum*), F2 (100% lead tree *Leucaena leucocephala*), F3 (100% groundnut *Arachis hypogea* L.), F4 (60% guinea grass plus 40% lead tree) and F5 (60% guinea grass plus 40% groundnut). Fermentation was conducted in a period of 21 days. After analysis of total count and grouping of lactic acid bacteria, the result showed that the average total count of LAB in all formulas were 10^6-10^7 cfu/g. A total of 282 different isolates were collected based on their morphology and could be divided into 4 genus. *Lactobacillus* sp. was found at a high incident in all silages, *Leuconostoc* sp. was found only in the F2 and F4 silages, whereas *Pediococcus* sp. and *Streptococcus* sp. were found only in the F1 and F5 silages. When grouping of the isolates based on physical characteristics and growth conditions, they can be divided into 20 groups (A-T). Group L, N and O were found at a high numbers about 30-40 isolates. Further identification of LAB species will be conducted by molecular biology approach.

คำสำคัญ : แบคทีเรียกรดแลคติก พืชอาหารสัตว์หมัก

Key Words : Lactic Acid Bacteria, Silage

* *นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง*

** *ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)*

*** *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง*

**** *รองศาสตราจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง*

บทนำ

ปัจจุบันการเลี้ยงโคนมของเกษตรกรในประเทศไทยได้เพิ่มมากขึ้น จากการสำรวจของกรมปศุสัตว์ พบว่าประชากรโคนมของประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2552-2553 มีประชากรโคนมจำนวน 483,899 และ 529,572 ตัว ตามลำดับ (กรมปศุสัตว์, 2552; 2553) โคนม จัดเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้อง (ruminant) ที่สามารถเปลี่ยนพืชอาหารหยาบ (roughage) เป็นน้ำนมได้ดี (เมธา, 2529) แต่ปัญหาที่พบมากที่สุด คือ การขาดแคลนพืชอาหารหยาบที่มีคุณภาพดีไว้ใช้เลี้ยงโคนมในช่วงฤดูแล้ง ในขณะที่ช่วงฤดูฝนกลับพบว่า มีพืชอาหารหยาบมากเกินความต้องการต่อการบริโภคของสัตว์ วิธีการแก้ไขปัญหาการขาดแคลนพืชอาหารหยาบที่มีคุณภาพดีสำหรับเลี้ยงโคนมดังกล่าวที่ให้ผลดีวิธีหนึ่งนั้น คือ การนำพืชอาหารหยาบที่มีคุณภาพดีในฤดูฝนมาทำการเก็บรักษาในรูปของพืชอาหารสัตว์หมัก (silage) ซึ่งจะช่วยรักษาคุณค่าของพืชอาหารหยาบที่ดีให้คงอยู่ (สมจิตร, 2549) โดยเกิดกระบวนการหมักภายใต้สภาวะไร้อากาศ (anaerobic condition) ของจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถใช้น้ำตาลในวัตถุดิบได้ ทำให้เกิดกรดแลคติกในปริมาณสูง ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ลดลง ซึ่งจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อนต่าง ๆ (spoilage) ที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของพืชอาหารสัตว์หมัก (McDonald *et al*., 1991; Brooker and Buckle, 1992)

อนึ่งวิธีการเก็บรักษาในสภาพที่เรียกว่า พืชอาหารสัตว์หมัก ปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้พืชอาหารสัตว์หมักสามารถเก็บรักษาได้อย่างสมบูรณ์และรวดเร็ว คือ ชนิดและจำนวนประชากรของแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) พบว่า ความหลากหลายของชนิดและจำนวนของแบคทีเรียดังกล่าว จะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืชอาหารสัตว์ที่นำมาทำการหมัก ทั้งนี้อาจเกิดจากความเหมาะสมกันระหว่างชนิดของพืชและชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีต่อกัน (สุรีลักษณ์และคณะ, 2545; สายัณห์, 2547; Cai *et al*., 1999; Ennahar *et al*., 2003; Wang *et al*., 2006; Parvin and Nishino, 2009)

พืชอาหารสัตว์หมัก ได้แก่ ข้าวฟ่าง หญ้ารูซี่ และข้าวโพด พบว่า สามารถแยกสายพันธุ์ *Lactobacillus* ได้จำนวน 10 สายพันธุ์ และบางสายพันธุ์ที่แยกได้มีการรายงานถึงความสามารถในการเป็นเชื้อโปรไบโอติก (probiotic) ในการผลิตอาหารสัตว์ได้ (สุรีลักษณ์และคณะ, 2545) ส่วนการศึกษาคุณสมบัติและจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ *Pediococcus* ที่แยกได้จากพืชอาหารสัตว์ ได้แก่ ข้าวโพด (*Zea mays*) ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) หญ้าอัลฟัลฟ่า (*Medicago sativa*) หญ้าอิตาเลี่ยน (*Lolium multiflorum*) และหญ้ากินนี (*Panicum maximum*) พบว่า มี 2 สายพันธุ์ที่มีลักษณะเด่นชัด ได้แก่ *P. acidilactici* และ *P. pentosaceus* (Cai *et al*., 1999) ขณะที่การศึกษาในฟางข้าวหมัก (*Oryza sativa* var. Hamasari) สามารถจำแนกเชื้อออกได้เป็น 6 สกุล (genus) ได้แก่ *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Weissella* (Ennahar *et al*., 2003) จากการศึกษาชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในพืชอาหารสัตว์หมักชนิดต่าง ๆ ส่งผลให้เกิดข้อมูลที่นำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการผลิตพืชอาหารสัตว์หมักให้มีคุณภาพที่ดียิ่งขึ้น

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นในการคัดแยกเชื้อและการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างพืชอาหารสัตว์หมักที่หาได้ในท้องถิ่นของประเทศ และเพื่อจัดเก็บเชื้อดังกล่าวนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพพืชอาหารสัตว์หมักต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้ในการผลิตพืชอาหารสัตว์หมัก ได้แก่ หญ้ากินนีสีม่วง (*Panicum maximum*) อายุการแตกกอ 45 วัน นำมาจาก อ.เมือง จ.ลพบุรี กระถินสด (*Leucaena leucocephala*) ไม่ทราบอายุแน่นอน นำมาจาก อ.เมือง จ.ลพบุรี และต้นถั่วลิสง (*Arachis hypogea* L.) ที่เก็บฝักแล้ว

นำมาจาก อ.หนองม่วง จ.ลพบุรี

การเตรียมตัวอย่างของพืชอาหารสัตว์ โดยตัดให้ได้ขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร จากนั้นผสมพืชตัวอย่างให้ได้เป็น 5 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 1 หญ้ากินนีสีม่วงหมัก 100% สูตรที่ 2 กระถินหมัก 100% สูตรที่ 3 ต้นถั่วลิสงหมัก 100% ส่วนสูตรที่ 4 และ 5 เป็นอัตราส่วนผสมตามการแนะนำจากการศึกษาของ Titterton and Maasdorp (1997) และ Muhammad *et al*. (2008) ระหว่างหญ้ากินนีสีม่วง 60% หมักร่วมกับกระถิน 40% และหญ้ากินนีสีม่วง 60% หมักร่วมกับต้นถั่วลิสง 40% โดยทุกสูตรมีการผสมเกลือ 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการบรรจุลงถังพลาสติกอัดให้แน่น แล้วทำการหมักไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30±4°C) เป็นเวลา 21 วัน หลังจากนั้นเปิดทำการเก็บตัวอย่าง โดยสุ่มเก็บตลอดถังให้ได้ตัวอย่างประมาณ 1 กิโลกรัม แล้วนำไปวิเคราะห์แยกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก

การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก ตามที่ดัดแปลงวิธีการจาก สุรีลักษณ์ และคณะ (2545) ชั่งตัวอย่างให้ได้ 10 กรัม นำมาเจือจางในน้ำกลั่นที่ผสม peptone powder 0.1% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 90 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำเทคนิค Serial dilution จนถึง 10^{-6} และเกลี่ย suspension ของเชื้อบนอาหารสูตร MRS agar (MERCK, Germany) ที่ผสม $CaCO_3$ 1% (AJAX FINECHEM, Australia) ด้วยเทคนิค Spread plate ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิห้อง (30±4°C) ในโหล (DURAN, Germany) สภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร บันทึกค่าจำนวนโคโลนี (cfu; colony forming unit) โดยถือว่า 1 cfu มาจากแบคทีเรียเริ่มต้น 1 เซลล์

การศึกษาสัณฐานวิทยาแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ตามวิธีการของ Kandler and Weiss (1986) เป็นการเลือกเก็บไอโซเลทของเชื้อ ตามลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่แตกต่างกัน การย้อมสีแกรม (Gram's stain) การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase enzyme) และการผลิตก๊าซ (Gas production) ในระหว่างการเจริญซึ่งใช้แบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร MRS agar ที่ผ่านการทำ Cross streak เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อบางประการ ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Kandler and Weiss (1986) Cai *et al*. (1997, 1999) และ Yang *et al*. (2010) โดยการศึกษาการเจริญของเชื้อในอาหารสูตร MRS broth (MERCK, Germany) บ่มที่อุณหภูมิ 10, 30 และ 45°C การเจริญของเชื้อในอาหารสูตร MRS broth ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3.5, 5.7 และ 9.6 และการเจริญของเชื้อในอาหารสูตร MRS broth ที่มีเกลือ NaCl (AJAX FINECHEM, Australia) ผสมอยู่ 1.0, 3.0, 6.5 และ 10.0% บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±4°C) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการทำ Cross streak แล้วจะเป็นการนำมาเลี้ยงใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±4°C) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วดูดตัวอย่างผสมกับ Glycerol 30% เก็บที่อุณหภูมิ -20°C (ดัดแปลงจาก Ennahar *et al*., 2003)

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

ปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากตรวจนับบนอาหารสูตร MRS agar ด้วยเทคนิค Spread plate และจำนวนของการเลือกเก็บไอโซเลทของเชื้อตามลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่แตกต่างกันของการบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±4°C) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 1 ปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 10^6-10^7 โคโลนี/กรัม ใกล้เคียงกับสุรีลักษณ์ และคณะ (2545) ที่รายงานว่า ปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จาก หญ้ารูซี่หมัก ข้าวฟ่างหมัก และข้าวโพดหมักอยู่ในช่วง 10^5-10^7 โคโลนี/กรัม สูตรที่ 3 ต้นถั่วลิสงหมัก 100% มีปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 4.35×10^7 โคโลนี/กรัม ในขณะที่ สูตรที่ 1 หญ้ากินนีสีม่วงหมัก 100% มีปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกต่ำสุดเท่ากับ 5.99×10^6 โคโลนี/กรัม ต่ำกว่ารายงานของ Parvin and Nishino (2009) ที่พบว่า มีปริมาณของเชื้ออยู่ในช่วง 10^7-10^{13} โคโลนี/กรัม เมื่อเลือก

ตารางที่ 1 ปริมาณและจำนวนไอโซเลทที่เลือกเก็บของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากพืชอาหารสัตว์หมัก

สูตรพืชหมัก	ปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติก (cfu/g)	จำนวนไอโซเลทที่เลือกเก็บ
1. หญ้ากินนีสีม่วงหมัก 100%	$5.99x10^6$	57
2. กระถินหมัก 100%	$3.99x10^7$	48
3. ต้นถั่วลิสงหมัก 100%	$4.35x10^7$	70
4. หญ้ากินนีสีม่วง 60% หมักร่วมกับกระถิน 40%	$1.87x10^7$	40
5. หญ้ากินนีสีม่วง 60% หมักร่วมกับต้นถั่วลิสง 40%	$1.64x10^6$	67

เก็บลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันตามวิธีการของ Kandler and Weiss (1986) ได้จำนวนรวมทั้งหมดเท่ากับ 282 ไอโซเลท ลักษณะของโคโลนีโดยทั่วไปของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากพืชอาหารสัตว์หมักทั้ง 5 สูตร จะมีลักษณะค่อนข้างทึบแสง โคโลนีมีลักษณะกลม (circular) ขอบเรียบ (entire) บริเวณด้านบนของโคโลนี จะมีลักษณะตั้งแต่แบนราบ (flat) นูน (raised) โค้งนูน (convex) และนูนตรงกลางของโคโลนีเล็กน้อย (umbonate) ส่วนสีของโคโลนีจะมีลักษณะตั้งแต่สีขาว จนถึงสีออกเหลืองขุ่นเล็กน้อย ซึ่งเป็นลักษณะที่ได้มีการรายงานไว้โดย สุรีลักษณ์ และคณะ (2545) Kandler and Weiss (1986) และ Stiles and Holzapfel (1997)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้และลักษณะทางกายภาพบางประการ แสดงดังตารางที่ 2 แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่ผลิตเอนไซม์คะตะเลส ลักษณะมีทั้งเป็นแบบท่อนหรือกลม (Kandler and Weiss, 1986; Stiles and Holzapfel, 1997) หรือบางสายพันธุ์อาจเป็นได้ทั้ง 2 ลักษณะ (Ennahar *et al*., 2003) แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ ส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นท่อนที่เรียงต่อกันเป็นสาย ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* sp. ที่ตรวจพบได้ในพืชอาหารหมักทั้ง 5 สูตร ซึ่งสุรีลักษณ์ และคณะ (2545) สายัณห์ (2547) Ennahar *et al*. (2003) Wang *et al*. (2006) Parvin and Nishino (2009) และ Yang *et al*. (2010) รายงานว่า สกุล *Lactobacillus* sp. เป็นสกุลที่มีการตรวจพบได้มาก และมีความหลากหลายทางสายพันธุ์ที่สูง ในขณะที่ *Leuconostoc* sp. เป็นชนิดที่พบรองลงมาโดยจะพบในสูตรที่ 2 และ 4 ของพืชอาหารสัตว์หมัก ส่วนสกุล *Pediococcus* sp. และ *Streptococcus* sp. จะพบว่า มีปริมาณที่ค่อนข้างน้อย ซึ่งพบเฉพาะสูตรที่ 1 และ 5 ของพืชอาหารสัตว์หมัก Cai *et al*. (1999) รายงานว่า สกุล *Pediococcus* sp. เป็นสกุลที่พบได้น้อยในพืชอาหารสัตว์หมักทั่วไป แต่สกุลดังกล่าวก็มีบทบาทที่สำคัญต่อการทำพืชอาหารสัตว์หมัก เช่นเดียวกับ *Streptococcus* sp. ที่ส่วนใหญ่จะพบว่า มีมากในผลิตภัณฑ์ที่เป็นนมหมัก (Kandler and Weiss, 1986; Stiles and Holzapfel, 1997)

ลักษณะทางกายภาพบางประการที่ได้จากการทดสอบบ่มที่อุณหภูมิ 10, 30 และ 45°C การเจริญของเชื้อในอาหารที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3.5, 5.7 และ 9.6 และการเจริญของเชื้อในอาหารที่มีเกลือผสมอยู่ 1.0, 3.0, 6.5 และ 10.0% สามารถแบ่งลักษณะที่ได้จากการทดสอบออกเป็น 20 กลุ่ม (กลุ่ม A-T) โดยกลุ่ม L จะมีจำนวนของเชื้อมากที่สุด (39 ไอโซเลท) พบว่า มีความคล้ายคลึงกับลักษณะทางกายภาพของกลุ่ม K ค่อนข้างมาก ทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันตรงการเจริญที่อาหารมีเกลือ 10% ในขณะที่กลุ่ม A, B และ E มีจำนวนของเชื้อน้อยที่สุด (4 ไอโซเลท) กลุ่ม A และ B จะมีลักษณะทางกายภาพที่คล้ายกันมาก ยกเว้นกลุ่ม E ถึงแม้จะมีปริมาณเท่ากัน แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียและลักษณะทางกายภาพบางประการ ช่วยให้แยกกลุ่มออกจากกันได้ชัดเจน เมื่อพิจารณาลักษณะดังกล่าว กลุ่ม A-J พบว่า มีลักษณะคล้ายกับ *Lactobacillus plantarum* และ *L. pentosus* (Cai *et al*., 1997; Yang *et al*., 2010) ทั้งสองสายพันธุ์มักตรวจพบเจอได้มากในพืชอาหารสัตว์หมัก (Wang *et al*., 2006; Parvin and Nishino, 2009) กลุ่ม K-Q มีลักษณะคล้ายกับ *L. casei* (Mohd Adnan and Tan, 2007) กลุ่ม R มีลักษณะคล้ายกับ *Pediococcus acidilactici* และ

ตารางที่ 2 คุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากพืชอาหารสัตว์หมัก[1]

คุณลักษณะ	กลุ่ม									
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**
จำนวนไอโซเลท	4	4	9	6	4	9	19	11	22	13
ลักษณะ	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน
แกรม	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
คะตะเลส	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
เกิดก๊าซจากกูลโคส	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ชนิดของการหมัก	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo
การเจริญที่อุณหภูมิ (^{0}C)										
10	+	+	+	+	+	W	W	W	W	W
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45	+	+	W	W	-	+	+	W	W	-
การเจริญที่ค่าความเป็นกรดด่าง										
3.5	+	+	+	W	+	+	+	+	+	+
5.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญที่อาหารมีเกลือ (%)										
1.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	W	-	W	-	-	W	-	W	-	-

[1] + = เจริญได้; W = เจริญได้เล็กน้อย; - = ไม่สามารถเจริญได้

ตารางที่ 2 คุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากพืชอาหารสัตว์หมัก[1] (ต่อ)

คุณลักษณะ	กลุ่ม									
	K	**L**	**M**	**N**	**O**	**P**	**Q**	**R**	**S**	**T**
จำนวนไอโซเลท	19	39	11	32	29	7	9	12	18	6
ลักษณะ	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	กลม	กลม	กลม
แกรม	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
คะตะเลส	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
เกิดก๊าซจากกูลโคส	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
ชนิดของการหมัก	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Homo	Hetero	Hetero
การเจริญที่อุณหภูมิ (^{0}C)										
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45	+	+	W	W	-	-	-	+	-	W
การเจริญที่ค่าความเป็นกรดด่าง										
3.5	+	+	+	+	+	W	W	W	-	W
5.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญที่อาหารมีเกลือ (%)										
1.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	W	-	W	-	-	W	-	-	-	W

[1] + = เจริญได้; W = เจริญได้เล็กน้อย; - = ไม่สามารถเจริญได้

P. pentosaceus (Cai *et al*., 1999) ส่วนกลุ่ม S และ T ถึงแม้ว่าจะมีลักษณะทางกายภาพที่คล้ายกับกลุ่ม R แต่จะเกิดก๊าซจากกระบวนการหมัก ช่วยทำให้สามารถแยกออกจากกลุ่ม R ได้ชัดเจน ทั้งสองกลุ่มจะมีลักษณะที่คล้ายกับ *Leuconostoc mesenteroides* และ *L. citreum* (Stiles and Holzapfel, 1997; Yang *et al*., 2010)

อย่างไรก็ตาม การศึกษาที่จะบอกถึงระดับสปีชีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติกได้นั้นจะต้องมีการศึกษาลงในระดับชีวเคมีด้านการหมักน้ำตาลของเชื้อ หรือแม้แต่การศึกษาทางชีวโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ข้อมูล 16S rDNA ซึ่งเป็นวิธีการที่จะช่วยยืนยันสปีชีย์ของเชื้อดังกล่าวได้อย่างแม่นยำและถูกต้อง

สรุปผลการวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในพืชอาหารสัตว์หมัก 5 สูตร ได้ทั้งหมด 282 ไอโซเลท โดยจัดกลุ่มตามลักษณะสัณฐานวิทยาได้ 4 สกุล ได้แก่ *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp. และ *Streptococcus* sp. และสามารถจัดกลุ่มตามลักษณะทางกายภาพและสภาวะการเจริญได้ 20 กลุ่ม ซึ่งเชื้อทั้งหมดจะนำไปวิเคราะห์สปีชีย์ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์มีการรายงานถึงการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกแก่สัตว์ การทดสอบคุณสมบัติด้านโปรไบโอติก จึงเป็นอีกสิ่งหนึ่งที่ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์. 2552. สถิติจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย ประจำปี 2552. ค้นเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2553, http://www.dld.go.th/ict/stat_web/yearly/yearly52/index52.html

กรมปศุสัตว์. 2553. สถิติจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย ประจำปี 2553. ค้นเมื่อ 23 พฤศจิกายน 2553, http://www.dld.go.th/ict/th/index.php?option=com_content&view=article&id=371:-2553&catid=207:-2553&Itemid=123

เมธา วรรณพัฒน์. 2529. โภชนะศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สายัณห์ ทัดศรี. 2547. พืชอาหารสัตว์เขตร้อน. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรีลักษณ์ รอดทอง, หนึ่ง เตียอำรุง และพงษ์ฤทธิ์ ครบปรัชญา. 2545. ความหลากหลายของสายพันธุ์แลคโตแบซิลลัสในหญ้าหมักของไทย. รายงานการวิจัย, นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สมจิตร ถนอมวงศ์วัฒนะ. 2549. การศึกษาคุณภาพของไซเลจต่อโครีดนม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Brooker, RM., and Buckle, AE. 1992. Lactic acid bacteria in plant silage, pp. 336-338. *In* Tilden, PW., and Cecava, MJ. (Eds.). Beef cattle feeding and nutrition. London: Academic Press.

Cai, Y., Kumai, S., Ogawa, M., Benno, Y., and Nakase, T. 1999. Chracterization and identification of Pediococcus species isolated from forage crops and their application for silage preparation. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2901-2906.

Cai, Y., Ohmomo, S., Ogawa, M., and Kumai, S. 1997. Effect of NaCl-tolerent lactic acid bacteria and NaCl on the fermentation characteristics and aerobic stability of silage. J. Appl. Microbiol. 83: 307-313.

Ennahar, S., Cai, Y., and Fujita, Y. 2003. Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. Appl. Environ. Microbiol. 69: 444-451.

Kandler, O., and Weiss, N. 1986. Regular, nonsporing Gram-positive rods, pp. 1208-1233. *In* Sneath, PHA., Mair, NS., Sharp, ME., and Holt, JG. (Eds.). Bergey's manual of systematic Bacteriology, vol.2. Baltimore: The Williams and Wilkins Co.

McDonald, P., Henderson, N., and Herson, S. 1991. The biochemistry of silage. 2nd ed. United Kingdom: Chalcombe.

Mohd Adnan, AF., and Tan, IKP. 2007. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. Bioresour. Technol. 98: 1380-1385.

Muhammad, IR., Baba, M., Mustapha, A., Ahmad, MY., and Abdurrahman, LS. 2008. Use of legume in the improvement o silage quality of columbus grass (*Sorghum almum* Parodi). Res. J. Anim. Sci. 2: 109-112.

Parvin, S., and Nishino, N. 2009. Bacterial community associated with ensilage process of witled guinea grass. Appl. Microbiol. 107: 2029-2036.

Stiles, NE., and Holzapfel, WH. 1997. Lactic acid bacteria of foods and current taxonomy. Int. J. Food Microbiol. 36: 1-29.

Titterton, M., and Maasdrop. 1997. Nutritional improvement of maize silage for dairying : mixed crop silages from sole and intercropped legume and a long season variety of maize. 2. Ensilage. J. Anim. Feed. Sci. Technol. 69: 263-270.

Wang, X., Haruta, S., Wang, P., Ishii, M., Igarashi, Y., and Cui, Z. 2006. Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and succession in alfalfa silage. FEMS Microbiol. Ecol. 57: 106-115.

Yang, J., Cao, Y., Cai, Y., and Terada, F. 2010. Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. J. Dairy Sci. 93: 3136-3145.