



รายงานการวิจัย

การอยู่รอดของแลคโตแบซิลไลจากหญ้าหมักในทางเดินอาหารของโค (The Survival of Silage Lactobacilli in the Digestive Tract of Cattle)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรสิทธิ์ รอดทอง

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิศิษฐ์พร สุขสมบัติ
2. นายพงษ์ฤทธิ์ ครอบปรัชญา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2540

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม 2545

บทคัดย่อ

แลคโตแบซิลไล (Lactobacilli) เป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตหญ้าหมักหรือ Silage เพื่อเป็นอาหารสัตว์ และผลิต Probiotics เพื่อเป็นอาหารเสริมของสัตว์ และยังพบได้เป็นปกติในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ในปัจจุบันมีการกล่าวถึงประโยชน์ที่เป็นไปได้หลายประการของ Lactobacilli ที่ใช้เป็น Probiotics สำหรับโคและกระบือ ได้แก่ ความสามารถในการเกาะติดกับผนังทางเดินอาหารของสัตว์และลดความเป็นกรด-ด่าง (pH) ทำให้ป้องกันหรือขัดขวางการเกาะและยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรค รวมถึงการทำให้หมดฤทธิ์ของสารพิษและกระตุ้นการสังเคราะห์สารเฉพาะชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ให้โทษในระบบทางเดินอาหาร การวิจัยของโครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงความสามารถในการอยู่รอดของ Silage lactobacilli ในทางเดินอาหารของโค ซึ่งจะเป็นข้อมูลชี้แนะถึงสายพันธุ์ของ Lactobacilli ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิต Silage และประโยชน์ในการพัฒนาการผลิต Probiotics สำหรับสัตว์อย่างมีประสิทธิภาพในประเทศไทย ซึ่งอาจจะเป็นการผลิต Probiotics ด้วยในผลผลิตอาหารสัตว์ชนิดเดียว ในการดำเนินการวิจัยนี้ได้ผลิต Silage เพื่อใช้เป็นอาหารของโคทดลองจากข้าวฟ่าง (พืชอาหารสัตว์) และหมักทั้งที่อาศัยจุลินทรีย์ที่มีหรือปนเปื้อนในวัตถุดิบและที่เติมหัวเชื้อ คือ *Lactobacillus plantarum* SUT-8 ที่แยกได้จาก Sorghum silage ที่ผลิต ณ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ผลิตภัณฑ์ Silage ที่ได้จากการหมักทั้งสองรูปแบบมีลักษณะทางกายภาพคล้ายกัน มีกลิ่นหอมของการหมัก และมีค่า pH ใกล้เคียงกันคือ 4.28 และ 4.32 ตามลำดับ ซึ่งจัดได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดี เมื่อให้อาหาร Silage แก่โคเจาะกระเพาะซึ่งได้แบ่งเป็นกลุ่มๆ ละ 2 ตัว ตามชนิดของอาหารที่ให้ คือ กลุ่มที่ 1 ได้รับหญ้าแห้งและอาหารข้น (กลุ่มควบคุม) กลุ่มที่ 2 ได้รับ Sorghum silage ที่ผลิตโดยไม่เติมหัวเชื้อและอาหารข้น และกลุ่มที่ 3 ได้รับ Sorghum silage ที่ผลิตโดยเติมหัวเชื้อและอาหารข้น และติดตามการคงอยู่และอยู่รอดของ Silage lactobacilli โดยเก็บตัวอย่างอาหารโคและจากระบบทางเดินอาหารของโคมาวิเคราะห์หา Lactobacilli ซึ่งพบว่าใน Silage ที่ผลิตโดยการเติมหัวเชื้อ มี Lactobacilli ในปริมาณ 5.40×10^8 CFU/กรัม (น้ำหนักเปียก) ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่า Silage ที่ผลิตโดยไม่เติมหัวเชื้อ ซึ่งพบจำนวน 1.12×10^7 CFU/กรัม และตรวจไม่พบแบคทีเรียดังกล่าวในหญ้าแห้งและอาหารข้น ส่วนปริมาณ Lactobacilli โดยเฉลี่ยที่ตรวจพบในตัวอย่างที่เก็บจาก Rumen และมูลของโคทดลองทั้ง 3 กลุ่ม ช่วงก่อนการให้อาหาร Silage มีจำนวนใกล้เคียงกันคือประมาณ 10^3 และ 10^2 CFU/กรัม ตามลำดับ ซึ่งได้ผลทำนองเดียวกันจากการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างที่เก็บ 2 ครั้งของช่วงเวลา 10 วันภายหลังจากหยุดให้อาหาร Silage แต่ในช่วงที่มีการให้อาหาร Silage อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 13 วัน จากการเก็บตัวอย่างจำนวน 4 ครั้ง พบปริมาณ Lactobacilli ที่ใกล้เคียงกันทั้ง 4 ครั้งของโคทดลองแต่ละกลุ่มและแตกต่างกันสำหรับโคต่างกลุ่มกัน โดยเฉลี่ยปริมาณที่ตรวจพบในของโค กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ในตัวอย่างที่เก็บจาก Rumen เท่ากับ

1.50×10^2 , 9.63×10^5 และ 2.81×10^6 CFU/กรัม ตามลำดับ เห็นได้ว่าโคทคลองที่ได้รับอาหาร Silage มีปริมาณ Lactobacilli ใน Rumen สูงขึ้นประมาณ 1.5-1.8 เท่าของโคทคลองที่ไม่ได้รับอาหาร Silage และพบ Lactobacilli ในมูลสัตว์จำนวน $<30(10)$, 1.67×10^2 และ 1.53×10^2 CFU/กรัม ตามลำดับ การอยู่รอดโดยเฉลี่ยของ Silage lactobacilli ในทางเดินอาหารของโคก่อนข้างคองที่ในช่วงที่โคได้รับอาหาร Silage อย่างต่อเนื่อง และลดน้อยลงหลังจากหยุดให้อาหาร Silage ซึ่งใกล้เคียงกับก่อนมีการให้อาหาร Silage แก่โคทคลอง จากการวิเคราะห์ชนิดของ Lactobacilli ที่แยกและเลือกเก็บทั้งจากตัวอย่างอาหารโคและตัวอย่างจากโคทคลอง โดยตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี พบ Lactobacilli ชนิดเด่นจำนวน 8 ชนิด คือ *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. fructosus* และ *L. hilgardii* และเมื่อใช้วิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD) เพื่อหาสายพันธุ์ของ Lactobacilli พบแบบแผน RAPD ที่แสดงสายพันธุ์ของ *L. plantarum* SUT-8 ที่ใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิต Sorghum silage ในทุกตัวอย่างที่เกี่ยวข้องกับ Silage ที่เติมหัวเชื้อ และในทุกครั้งที่เก็บตัวอย่างจากโคทคลองในช่วงที่โคได้รับอาหารดังกล่าวต่อเนื่องเป็นเวลา 13 วัน และยังคงพบหลังจากหยุดให้อาหาร Silage แล้ว 10 วัน จึงอาจสรุปได้ว่า *Lactobacillus* สายพันธุ์ดังกล่าวมีความสามารถในการเกาะติดและเจริญในระบบทางเดินอาหารของโค และมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เพื่อเป็นหัวเชื้อที่เหมาะสมในการผลิต Silage

Abstract

Lactobacilli are a group of bacteria which play an important role in the production of silage, an animal feed, as well as probiotics, a live microbial feed supplement; and normally found in the digestive tract of ruminants. Currently, possibility benefits of lactobacillus probiotics in cattle have been proposed as follows: the bacterial adhesion to the gut wall and the decrease in pH which resulted in the interference and protection as well as inhibition of animal pathogen adhesion and growth, the neutralization of enterotoxins, and the stimulation of anti-microbial substance syntheses. This research project reports the survival of silage lactobacilli in the digestive tract of cattle which will be useful for the selection of the suitable bacterial strain(s) for applying as silage inoculant(s) in Thailand and possibly as probiotics for the same strain. To obtain the silage lactobacillus survival data, silages produced by fermentation processes both without and with the addition of inoculants were prepared. Forage sorghum was used as the raw material. *Lactobacillus plantarum* SUT-8 isolated from sorghum silage produced at Suranaree University of Technology Farm was chosen to be used as the silage inoculant. Sorghum silages obtained from fermentation processes both without and with the addition of inoculants were very similar in appearance and good qualities. The two silages had their pH value of 4.28 and 4.32 respectively. Six fistulated cows divided into three groups according to their feeds were tested for the survival of silage lactobacilli in their digestive tracts. The first animal group was fed with hay and a concentrated feed (the control group). The second and third groups were fed with sorghum silages produced from fermentation processes without and with the addition of inoculants. The concentrated feed was also fed the last two group of cows. The numbers of lactobacilli in all feed and digestive tract samples were determined. The lactobacillus numbers of 5.40×10^8 CFU/g (wet weight) were found in silage containing inoculant, and 1.12×10^7 CFU/g in silage without inoculant. None of lactobacilli was detected in both hay and the concentrated feed. Before feeding cows with silages, the three animal groups contained similar numbers of lactobacilli in their rumen and feces which were 10^3 and 10^2 CFU/g (wet weight) respectively. Similar results were obtained for the three animal groups after stopping silage feeding. When feeding the animals with silages for 13 days, samples were collected from their rumen and feces 4 times at interval between 10 and 13 days of feeding. It was found that numbers of lactobacilli were consistent in both rumen and fecal samples of all cows

within each group but different between groups during feeding the animals with silages. The average numbers in rumen samples were 1.50×10^2 , 9.63×10^5 and 2.81×10^6 CFU/g for the first, second, and third animal groups respectively. The cows fed with sorghum silages contained numbers of lactobacilli in their rumens about 1.5-1.8 times higher than the animals fed with hay. For their fecal samples, the average numbers of lactobacilli found were $<30(10)$, 1.67×10^2 and 1.53×10^2 CFU/g respectively. The survival of silage lactobacilli in the digestive tract of cattle was rather consistent during silage feeding, but decreased after stopping feeding silage. For the identification of selected dominant lactobacillus isolates found from both silages and digestive tracts of cattle into the species level using traditional phenotypic and biochemical tests, eight species could be recorded as follows: *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. fructosus* and *L. hilgardii*. When using the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method for differentiating lactobacillus strains, *Lactobacillus plantarum* SUT-8, the silage inoculant, was detected in all silage and animal samples concerned with the silage produced by adding the inoculant. It reveals that the *L. plantarum* strain has its colonisation capability in the digestive tract of cattle, and could be applied as the suitable silage inoculant.