รหัสโครงการ SUT1-104-39-12-03

รายงานการวิจัย

ความหลากหลายของสายพันธุ์แลคโตแบซิลลัสในหญ้าหมักของไทย

(Diversity of *Lactobacillus* Strains in Thai Silage)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

2. นายพงษ์ฤทธิ์ ครบปรัชญา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2539

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤษภาคม 2545

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้การสนับสนุนด้านงบประมาณที่เป็นค่าใช้จ่าย พร้อมเครื่องมือและห้องปฏิบัติการในการดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิศิษฐิพร สุขสมบัติและฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย บริษัทแดรี่ ซัพพลาย แอนด์เซอร์วิส จำกัด ฟาร์มโชคชัย และฟาร์มมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างหญ้าหมัก/Silage และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อที่ปรึกษาของโครงการวิจัยสองท่านคือ ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และ Professor Dr. Gerald W. Tannock *ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัย Otago ประเทศนิวซีแลนด์*

บทคัดย่อ

แลคโตแบซิลไล (Lactobacilli) เป็นแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตหญ้าหมักหรือ Silage ซึ่งใช้เป็นอาหารสัตว์และผลิต Probiotics เพื่อเป็นอาหารเสริมของสัตว์ที่มีผลในการปรับสมดุลย์ของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์นั้น การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ข้อมูลด้านความหลากหลายของสายพันธุ์ของ Lactobacilli ที่พบใน Silage จากแหล่งผลิตในประเทศไทย ซึ่งจะให้ประโยชน์ในการพัฒนาหัวเชื้อเพื่อใช้ในการผลิต Silage และจุลินทรีย์ที่อาจใช้เป็น Probiotics สำหรับสัตว์ จากการวิเคราะห์หา Lactobacilli ในตัวอย่าง Silage จำนวน 27 ตัวอย่าง ที่ได้จากกระบวนการหมักโดยธรรมชาติจากแหล่งผลิต 6 แหล่ง ในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งตัวอย่าง Silage ที่ได้นี้มี 3 ชนิดหรือประเภทหลัก ตามพืชวัตถุดิบที่ใช้ผลิต คือ Sorghum silage, Grass silage และ Corn silage พบปริมาณ Lactobacilli โดยเฉลี่ยใน Sorghum silage และ Grass silage ใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วง 10^5 ถึง 10^7 CFU/กรัมของ Silage (น้ำหนักเปียก) สำหรับ Corn silage มีปริมาณ Lactobacilli ที่ตรวจพบโดยเฉลี่ยสูงถึง 10^8 CFU/กรัม และเมื่อเลือกเก็บไอโซเลทของ Lactobacilli ได้จำนวน 370 ไอโซเลท ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่แตกต่างกันเพื่อวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ สามารถระบุชนิดของ Lactobacilli ชนิดเด่นซึ่งส่วนใหญ่แยกได้จาก Silage ทุกประเภทที่ศึกษาได้จำนวน 10 ชนิด คือ *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. farciminis*, *L. fermentum*, *L. fructosus* และ *L. gasseri* และจากการพัฒนาวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD) เพื่อศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ของ Lactobacilli ชนิดเด่นได้ผลสรุปดังนี้ *Lactobacillus plantarum* มีความหลากหลายของสายพันธุ์อย่างน้อย 8 สายพันธุ์ Lactobacilli ชนิดที่มีความหลากหลายของสายพันธุ์อย่างน้อย 3 สายพันธุ์คือ *L. casei* และ *L. fermentum* และชนิดที่มีความหลากหลายของสายพันธุ์อย่างน้อย 2 สายพันธุ์คือ *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. delbrueckii* และ *L. gasseri* ซึ่ง Lactobacilli บางชนิด ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* และ *L. delbrueckii* มีรายงานการใช้เพื่อผลิต Probiotics สำหรับสัตว์

Abstract

Lactobacilli are bacteria belonging to the genus *Lactobacillus*. They play their important roles in the production of both silage, an animal feed, and probiotics, a live microbial feed supplement. This study aims to obtain the diversity data of *Lactobacillus* strains found in natural Thai silage. The data will be useful for the development of silage inoculants as well as probiotics in local areas. Twenty seven silage samples naturally produced were collected from six silage production places in the Central and North-eastern Thailand. Three principal types of silage samples categorized according to plant species used as raw materials: sorghum, grass, and corn silages, were obtained. From the investigation of lactobacilli in these silage samples, sorghum and grass silages contained the similar average lactobacillus numbers which were in the range of 10^5 to 10^7 CFU/g (wet weight). Corn silage contained the approximate numbers of 10^8 CFU/g. Three hundred and seventy lactobacillus isolates were selected according to their difference in colony morphology for identification and differentiation. The dominant isolates mostly found in all silage samples were identified as to species of *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. farciminis*, *L. fermentum*, *L. fructosus*, and *L. gasseri* by traditional phenotypic and biochemical tests. At least 8 strains of *L. plantarum*, 3 strains of *L. casei* and *L. fermentum*, and 2 strains of *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. delbrueckii*, and *L. gasseri* were found when the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method was used for differentiating lactobacillus strains. *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, and *L. delbrueckii* have been reported to be applied as probiotics.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ฉ
สารบัญภาพ ..... ช
บทที่ 1 บทนำ
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 7
ขอบเขตของการวิจัย 8
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 8
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย
อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย..... 9
การเก็บและรวบรวมตัวอย่าง Silage จากแหล่งผลิต..... 10
การวิเคราะห์หาแบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacilli ในตัวอย่าง Silage 10
การวิเคราะห์ชนิดของ Lactobacilli ที่แยกได้จาก Silage..... 11
การศึกษาความหลากหลายสายพันธุ์ของ Lactobacilli ที่แยกจาก Silage โดยใช้
วิธีทางกรดนิวคลีอิค..... 13
บทที่ 3 ผลการวิจัย
ตัวอย่าง Silage ที่รวบรวมได้จากแหล่งผลิต..... 18
ผลการวิเคราะห์หาแบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacilli ในตัวอย่าง Silage..... 23
ผลการวิเคราะห์ชนิดของ Lactobacilli ที่แยกได้จาก Silage โดยอาศัยสัณฐาน
วิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรีย..... 30
ผลการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ของ Lactobacilli โดยใช้วิธีทางกรดนิวคลีอิค..... 38
บทที่ 4 บทสรุป
สรุปผลการวิจัย 44
ข้อเสนอแนะ 46
บรรณานุกรม 47

หน้า

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สีย้อมจุลินทรีย์..... 52

ภาคผนวก ข น้ำยาเคมี..... 52

ภาคผนวก ค อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์..... 54

ประวัติผู้วิจัย 56

เอกสารแนบ 63

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 RAPD Analysis Primers ที่ใช้ในการวิเคราะห์ *Lactobacillus* strains ด้วยวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD)..... 16

ตารางที่ 3.1 แหล่งผลิต Silage ที่ได้รับความอนุเคราะห์ให้นำตัวอย่าง Silage มาวิเคราะห์หาแบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacilli..... 20

ตารางที่ 3.2 ปริมาณ Lactobacilli ที่ตรวจพบในตัวอย่าง Silage จำนวนไอโซเลทของ Lactobacilli ที่เลือกเก็บเพื่อศึกษาชนิดและสายพันธุ์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของตัวอย่าง Silage ที่เก็บจากแหล่งผลิต 6 แหล่งในประเทศไทย..... 24

ตารางที่ 3.3 ปริมาณ Lactobacilli ที่ตรวจพบในตัวอย่าง Silage จำนวนไอโซเลทของ Lactobacilli ที่เลือกเก็บเพื่อศึกษาชนิดและสายพันธุ์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของตัวอย่าง Silage ที่ทดลองผลิตจากพืชอาหารสัตว์ต่างสายพันธุ์จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี..... 26

ตารางที่ 3.4 Lactobacilli ชนิดเด่น ที่ตรวจพบใน Silage ที่ผลิตในประเทศไทย จากกลุ่มเชื้อที่ได้แยกคัดเลือกมาวิเคราะห์ชนิด..... 36

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 3.1 ตัวอย่าง Silage ที่เก็บจากแหล่งผลิต..... 21
รูปที่ 3.2 โคโลนีของ Silage lactobacilli อายุ 48 ชั่วโมงที่เจริญบน Rogosa agar..... 32
รูปที่ 3.3 สายพันธุ์เด่นของ Lactobacilli ที่แยกได้จากตัวอย่าง Silage ภาพจากกล้อง 33
จุลทรรศน์ที่ใช้แสงของเซลล์ Lactobacilli ที่ผ่านการย้อมสีแบบแกรม .....
รูปที่ 3.4 ตัวอย่างแบบแผน Carbohydrate fermentation ของ Lactobacilli ที่แยกได้จาก
ตัวอย่าง Silage..... 34
รูปที่ 3.5 ผลการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ DNA ของLactobacilli 40
โดยใช้ RAPD Analysis Primer 2 ชนิด.....
รูปที่ 3.6 แบบแผน RAPD ของ Lactobacilli เมื่อใช้ Primer 3..... 41
รูปที่ 3.7 แบบแผน RAPD ของ Lactobacilli ชนิดเด่นที่พบใน Silage จากแหล่งผลิตใน
ประเทศไทย..... 43

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

แลคโตแบซิลไล (Lactobacilli) เป็นจุลินทรีย์ในสกุล (Genus) *Lactobacillus* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตหญ้าหมักหรือ Silage สำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์และผลิต Probiotics (จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นอาหารเสริมของสัตว์มีผลในการปรับสมดุลย์ของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์นั้น) จุลินทรีย์ในสกุล *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเซลล์เป็นท่อน (rod-shaped cell) ที่มีขนาดโดยปกติอยู่ในช่วง 0.5-1.2 x 1.0-10.0 ไมโครเมตร และมักพบเซลล์เป็นท่อนยาว แต่อาจพบเซลล์เซลล์สั้นเกือบกลมก็ได้ เซลล์เรียงตัวเป็นสายสั้นๆ เป็นส่วนใหญ่ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่แต่อาจพบบ้างที่เซลล์เคลื่อนที่ด้วย Peritrichous flagella พบทั้ง Microaerophiles, Facultative anaerobes และ Anaerobes การเจริญมักถูกกระตุ้นด้วย 5% Carbon dioxide อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญอยู่ในช่วง 30-40°ซ. เป็นพวก Chemoorganotrophs ที่ต้องการธาตุอาหารสมบูรณ์ และสร้าง Lactic acid เป็นผลผลิตหลัก (อย่างน้อย 50%) จากกลูโคสและคาร์โบไฮเดรทอื่นๆ โดย Fermentative metabolism แบคทีเรียในสกุลนี้ยังแบ่งย่อยได้เป็นอีก 2 พวกหลักตาม Fermentation pathways คือพวกที่มี Homolactic fermentation ซึ่งผลิต Lactic acid เท่านั้นเป็นผลผลิตจากการใช้น้ำตาล และพวกที่มี Heterolactic fermentation ซึ่งเป็นพวกที่ใช้น้ำตาลแล้วเกิด Lactic acid และผลผลิตอื่นด้วย ได้แก่ Acetic acid, Ethanol, Carbon dioxide, Formic acid พบ Lactobacilli ได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็น Normal microflora ในพืชและสัตว์ ซึ่งตามปกติมีถิ่นที่อยู่อาศัยเป็นระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลือดอุ่นและนก (Kandler and Weiss, 1986; Holt *et al.*, 1994) ซึ่ง *Lactobacillus* species ที่พบใน Silage ตามที่มีรายงานได้แก่ *Lactobacillus brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. coryniformis*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* (Kandler and Weiss, 1986; Brookes and Buckle, 1992)

หญ้าหมัก หรือ Silage เป็นอาหารสัตว์ซึ่งได้จากกระบวนการหมักพืชที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Lactic acid bacteria ที่มีความสามารถสร้างกรดชนิด Lactic acid เป็นผลผลิตหลักในการเจริญ ซึ่ง Lactic acid bacteria ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิต Silage อยู่ในสกุล *Lactobacillus* และ *Pediococcus* (Hill and Hill, 1986; Cai *et al.*, 1999) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Lactobacillus* กรดที่เกิดในกระบวนการหมักเป็นสารช่วยในการถนอมอาหาร ซึ่งวัตถุประสงค์ของการผลิตหญ้าหมักหรือ Silage ก็คือการถนอมพืชอาหารสัตว์ไว้ใช้ในฤดูหนาวหรือฤดูแล้งซึ่งเป็นช่วง

ที่ไม่สามารถผลิตพืชอาหารสัตว์สดได้ ถือได้ว่าการผลิต Silage เป็นกระบวนการหนึ่งที่ช่วยลดการขาดแคลนอาหารสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงฤดูกาลที่ไม่สามารถผลิตพืชอาหารสัตว์สดได้และมีคุณค่าทางอาหารสูงกว่าหญ้าแห้ง

ในประเทศไทยก็มีความต้องการพืชอาหารสัตว์สำหรับโคและกระบือในปริมาณที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากอดีตถึงปัจจุบัน เห็นได้จากรายงานของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2545) ที่มีการพัฒนาเพื่อเพิ่มการผลิตผลผลิตข้าวโพดอาหารสัตว์เนื่องจากความต้องการ ในปี พ.ศ. 2541, 2542 และ 2543 ซึ่งได้เท่ากับ 535, 569 และ 582 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ และเมื่อคำนึงถึงจำนวนโคปัจจุบันในประเทศไทยมีจำนวนโคทั้งสิ้น 5,677,059 ตัว เป็นโคที่เลี้ยงในภาคเหนือจำนวน 1,470,820 ตัว ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 2,306,578 ตัว ภาคกลาง 1,211,195 ตัว และภาคใต้ 688,466 ตัว ซึ่งเฉพาะในจังหวัดนครราชสีมา มีจำนวนถึง 378,123 ตัว (ข้อมูล ณ วันที่ 1 มกราคม 2542; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2545) ดังนั้นการผลิต Silage จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ทำให้ได้อาหารสัตว์ที่เพียงพอกับความต้องการใช้ในทุกฤดูกาลหรือลดปัญหาการขาดแคลนพืชอาหารสัตว์ในฤดูแล้งในบางพื้นที่ ดังตัวอย่างเช่น เกษตรกรในภาคเหนือที่พยายามผลิต Silage จาก ต้น เปลือกและฝักข้าวโพดอ่อนที่เหลือจากโรงงาน โดยหมักในภาชนะที่สานด้วยไม้ไผ่และกรุด้วยพลาสติกตามที่ได้รับการแนะนำจากศูนย์วิจัยพืชอาหารสัตว์ จังหวัดลำปาง สามารถผลิตได้ 2-3 ตัน ทำให้บรรเทาความเดือดร้อนในช่วงที่ขาดแคลนพืชอาหารสัตว์ในฤดูแล้งได้

วัตถุดิบที่มีการนำมาใช้ผลิต Silage มีทั้ง หญ้า ข้าวโพดและข้าวฟ่าง (รวมลำต้นและใบ) เมล็ดธัญพืช ฟางข้าว และพืชตระกูลถั่ว (Allen, 1990; Gillespie 1992) ซึ่งพืชที่นำมาผลิต Silage ที่มีคุณภาพดี ควรมีปริมาณน้ำตาลสูง อย่างน้อยควรมีประมาณ 3% ขณะที่มีการตัด (Allen, 1990) และในการผลิต Silage อาจใช้วัตถุดิบ (พืช) ชนิดเดียวหรือหลายชนิดผสมกันก็ได้ เช่น หญ้าผสมกับพืชตระกูลถั่ว (Gillespie, 1992) โดยบรรจุวัตถุดิบในภาชนะบรรจุได้หลายรูปแบบ ได้แก่ บ่อหมัก (บ่อดินหรือบ่อซีเมนต์) ถังหมัก (Bucket) ฉาง (เช่น ชนิด Airtight silo) ห่อหรือม้วน (Bale) ขนาดใหญ่ หรือภาชนะบรรจุที่ลดการแพร่ของออกซิเจน (อากาศ) ไปยังวัตถุดิบในระหว่างที่มีการหมักโดยจุลินทรีย์ ทั้งนี้เพื่อให้เกิดสภาพไร้ออกซิเจน (Anaerobic condition) มากที่สุด การผลิต Silage อาจโดยอาศัยการหมักพืชตามธรรมชาติ อาศัยจุลินทรีย์ที่มีหรือปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ และในการผลิตอาจเติมแหล่งอาหารเสริมสำหรับจุลินทรีย์ เช่นเติมกากน้ำตาล (Molasses) การผลิต Silage โดยอาศัยการหมักตามธรรมชาตินี้มักได้ผลผลิตที่มีคุณภาพไม่แน่นอน แต่ยังเป็นวิธีที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน รวมถึงในประเทศไทย

การผลิต Silage ในรูปแบบที่พัฒนาขึ้นจะใช้หัวเชื้อ (Inoculant หรือ Starter culture) ตัวอย่างเช่น ในสหราชอาณาจักร (UK) มีการผลิตหัวเชื้อ Silage เป็นการค้า (Rooke, 1991) ผลดีจากการ

ใช้หัวเชื้อคือ ระยะเวลาการหมัก (การเกิดกรด) สั้นกว่าการผลิตโดยอาศัยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ซึ่งช่วยป้องกันการสูญเสียคุณค่าทางอาหารของผลผลิตได้ดีกว่าการหมักตามธรรมชาติ กรณีการผลิตที่มีการเติมหัวเชื้อ อาจมีการเติมเอนไซม์ที่ย่อยสารประกอบคาร์โบไฮเดรท และ/หรือเอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลสลงไปก่อนเติมหัวเชื้อ แบคทีเรีย Lactobacilli เป็นจุลินทรีย์ที่นิยมใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิต Silage และที่มีรายงานการใช้มากคือ *Lactobacillus plantarum* (Hill and Hill, 1986; Cocconcelli *et al.*, 1991; Flores, 1991; Rooke, 1991; Fitzsimons *et al.*, 1992; Sharp *et al.*, 1992; Weinberg *et al.*, 1993)

การพัฒนาด้านการผลิต Silage เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีและคงที่ ยังคงมีอยู่อย่างต่อเนื่อง เห็นได้จากตัวอย่างเช่น Cocconcelli *et al.* (1991) ได้รายงานการใช้ *Lactobacillus plantarum* L30 และ *Lactobacillus plantarum* L40 และ *Pediococcus pentosus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อออกซิเจน เป็นหัวเชื้อในการผลิต Silage และความพยายามในการผลิต Silage อย่างมีประสิทธิภาพจากวัตถุดิบที่มีสารประกอบคาร์โบไฮเดรทที่มีโครงสร้างซับซ้อน มีปริมาณสูง และย่อยสลายยากโดยจุลินทรีย์ เช่น แป้ง และ เซลลูโลส เป็นต้น

การย่อยสารประกอบคาร์โบไฮเดรทประเภทแป้ง เป็นเป้าหมายหลักในการผลิต Silage จาก ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และเมล็ดธัญพืช ซึ่งให้คุณค่าทางอาหารสูงกว่า Grass silage ได้มีรายงานการสร้าง Prototype recombinant strain ของ *Lactobacillus plantarum* โดยบรรจุ Gene ที่บงการการสร้าง α-Amylase ใน Plasmid ของแบคทีเรียดังกล่าว แต่สภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่แบคทีเรียเจริญได้ดีไม่สอดคล้องกับสภาพที่เหมาะสมกับการแสดงออกของ Gene ที่สร้าง α-Amylase และการทำงานของเอนไซม์นั้น (Scheirlinck *et al.*, 1989; Jones and Warner, 1990) นอกจากนี้การย่อยแป้งที่ได้ผลผลิตน้ำตาล ต้องการชุดของเอนไซม์ α-Amylase, β-Amylase และ Debranching enzymes

สำหรับการย่อยเซลลูโลสที่เป็นส่วนประกอบหลักของพืช เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นอย่างช้าๆ และเกี่ยวข้องกับ complex interaction ของเอนไซม์ แหล่งของเอนไซม์ที่ย่อยเซลลูโลสที่สำคัญคือจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและรา ซึ่งในการผลิต Silage ยังพบว่ามีการเติมเอนไซม์ α-1,4 Endogluconase (Carboxy methyl cellulase) เพื่อช่วยย่อยสลายเซลลูโลส นอกจากนี้ยังมีรายงานการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Lactobacillus plantarum* โดยสร้าง Prototype strain ที่มี Gene ซึ่งเกี่ยวข้องกับ Endogluconase activity อยู่ที่ Chromosome (Bates *et al.*, 1989) ข้อจำกัดของประสิทธิภาพของแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ที่สภาพความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียและกิจกรรมของเอนไซม์ ทำนองเดียวกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ย่อยแป้งดังกล่าวข้างต้น

Nadeau *et al.* (2000) พบว่าการเติมเอนไซม์ Cellulase (2 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัม; 2500 IU ต่อมิลลิลิตร) จาก *Trichoderma longibrachiatum* ที่ผลิตเป็นการค้า ลงในกระบวนการผลิต Silage

จาก Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) และ Alfalfa (*Medicago sativa* L.) ทำให้กระบวนการหมักดีขึ้น และดียิ่งขึ้น (กระตุ้น Homolactic fermentation) เมื่อใช้ร่วมกับหัวเชื้อ (*Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus cerevisiae*) แต่ถ้าเติม Formic acid เพิ่มลงไปในกระบวนการหมัก มีผลให้ปริมาณกรดทั้งหมดที่เกิดขึ้นลดลงกว่าที่ไม่เติม เนื่องจาก Formic acid จำกัดกระบวนการหมักน้ำตาลในวัสดุหมัก

Silage ที่มีคุณภาพดีควรมีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) อยู่ในช่วง 4.0-4.5 (Allen, 1990) กรณี Grass silage และ Legume silage ควรมีปริมาณความชื้น (Moisture content) อยู่ในช่วง 50-65% (Gillespie, 1992) และมี Crude protein content ประมาณ 15-20% Silage ที่ผลิตเพื่อเลี้ยงโคหรือกระบือ ควรมีค่า Digestibility (D) สูงกว่า 0.63 มีน้ำหนักแห้งอย่างน้อย 25% และมีกลิ่นหอมของการหมักที่เกิดขึ้นโดย Lactic acid bacteria (Allen, 1990)

ปัญหาในการผลิต Silage เกิดขึ้นได้ง่าย เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนหรือการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ก่อให้เกิดการเสียของ Silage ได้ดังนี้

ก) Anaerobic spoilage

ส่วนใหญ่เกิดจากแบคทีเรียกลุ่ม Clostridia ย่อยสลายสารอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีนในวัสดุหมัก แบคทีเรียกลุ่มนี้จะปนเปื้อนมาจากดิน ทั้งกับวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้อง

ข) Aerobic spoilage

พบว่าเกิดจากยีสต์และราซึ่งปนเปื้อนจากอากาศ ทั้งในระหว่างกระบวนการผลิตที่มีการสัมผัสอากาศมาก และระหว่างการให้ Silage แก่สัตว์เลี้ยง เชื้อราที่มักพบปนเปื้อนใน Silage ได้แก่ *Aspergillus*, *Monascus* และ *Penicillium* ราชนิดหนึ่งที่พบได้เป็นปกติคือ *Penicillium roqueforti* ที่สามารถสร้าง Secondary metabolites เช่น Roquefortine C, Isofumiclavines A และ B, PR toxin, Macrofortines และ Mycophenolic acid เป็นต้น (Pelhate, 1977; Cole and Cox, 1981; Nout *et al.*, 1993; Frisvad and Thrane, 1996) และมีรายงานการตรวจพบ Roquefortine C บ่อยครั้งใน Silage (Häggblom, 1990; Auerbach *et al.*, 1998; Tüller *et al.*, 1998) ซึ่งไม่เป็นผลดีต่อสัตว์ที่บริโภค

มีข้อวิจารณ์ว่า Silage ที่ได้จากการหมักด้วย Homolactic inoculant นั้นจะเสียในสภาพมีอากาศ (aerobic spoilage) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดขึ้นโดยกิจกรรมของยีสต์ในระหว่างการเก็บ ได้ง่ายกว่า Silage ที่หมักโดยธรรมชาติ เนื่องจาก Silage ที่หมักโดยธรรมชาตินั้นมีกรดหลายชนิดเช่น Acetic acid, Propionic acid, Butyric acid เกิดขึ้นด้วย และกรดเหล่านี้มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของยีสต์และรา (Weinberg *et al.*,1993)

Weinberg *et al.* (1993) รายงานผลของการใช้ Lactic acid bacteria inoculants ที่ผลิตเป็นการค้า ต่อการคงตัวในสภาพที่มีออกซิเจน (อากาศ) (Aerobic stability) ของ Silage ในห้องปฏิบัติการ พืชที่นำมาใช้ผลิต Silage มีทั้ง เมล็ดข้าวสาลี (Wheat) ข้าวโพด และข้าวฟ่าง โดยตัดพืชเป็นชิ้นและบรรจุใน Anaerobic jar ขนาด 1.5 ลิตร หัวเชื้อ (Inoculant) ที่ใช้ มี 3 ชุด คือ ชุดที่ 1 เป็น H/M F inoculant No. 9927 (Medipharm, USA) ประกอบด้วยเชื้อแห้งผง (powder) ที่มีจำนวนต่ำสุด 5 x 10^9 CFU/กรัมของเชื้อแห้ง ของเชื้อผสม *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* และ *Pediococcus acidilactici* ชุดที่ 2 เป็น Sil-All (Allteck, UK) ประกอบด้วยเชื้อผสม *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* และ *Pediococcus acidilactici* ที่ไม่ได้ระบุจำนวน และเอนไซม์ Cellulase, Hemicellulase และ Amylase และชุดที่ 3 เป็น Lacticil M74 (Medipharm, Sweden) ประกอบด้วยเชื้อแห้ง *Enterococcus faecium* ที่มีจำนวนต่ำสุด 1.5 x 10^{10} CFU/กรัม การเติมหัวเชื้อลงในพืชที่เป็นวัตถุดิบโดยเฉลี่ยใช้ 0.5 x 10^6 CFU/กรัม และมี Control silage ที่ไม่เติมหัวเชื้อ ภายหลังการหมักเป็นเวลา 45 วัน นำ Silage มาทดสอบ Aerobic stability พบว่า Silage ที่ได้จากการเติมหัวเชื้อเกิดการเสียเร็วกว่า Control silage เนื่องจาก Silage ที่ได้จากการเติมหัวเชื้อมีปริมาณ Residual water-soluble carbohydrates และ Lactic acid สูงกว่า และขาดหรือมี Volatile fatty acids (เช่น Acetic acid, Propionic acid, Butyric acid) ในปริมาณน้อย ซึ่ง Volatile fatty acids เหล่านี้มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์และรา และพบว่าการเสียในสภาพที่มีออกซิเจนของ Silage ที่ได้จากการเติมหัวเชื้อครั้งนี้เกิดเนื่องจากกิจกรรมของยีสต์เป็นหลัก

Cai *et al.* (1997) ได้ทดลองใช้ Additives ที่เติมลงในข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) ที่ใช้ผลิต Silage ดังนี้ (1) *Lactobacillus casei* LC-10 ซึ่งเป็น Lactic acid bacterium ที่ทนเกลือ (NaCl) (2) *Lactobacillus plantarum* LP-15 ซึ่งเป็น Lactic acid bacterium อีกสายพันธุ์หนึ่งที่ทนเกลือ (3) เกลือ (NaCl) 40 กรัมต่อกิโลกรัมของข้าวฟ่างสด (4) เกลือและ *Lactobacillus casei* LC-10 (5) เกลือและ *Lactobacillus plantarum* LP-15 เปรียบเทียบกับการหมักข้าวฟ่างที่ไม่เติมใดๆ (Control silage) พบว่าในช่วงแรกของการหมักมีปริมาณ Lactic acid bacteria ในข้าวฟ่างหมักที่เติมทุก Additives สูงกว่า Control silage อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และระหว่างกระบวนการหมัก Silage นั้น ทั้งที่มีการเติมเกลือหรือการเติม Lactic acid bacteria สามารถยับยั้งการเจริญของ Aerobic bacteria และ Clostridia ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ และทุกการทดลองที่เติม Additives มีค่า pH, Ammonia-nitrogen content, Dry matter loss และการผลิตก๊าซ ต่ำกว่า Control silage อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่มี Lactic acid content และ Residual water soluble carbohydrates สูงกว่า Control silage อย่างมีนัยสำคัญ คุณภาพที่ดีของผลิตภัณฑ์ Silage ที่ได้เรียงเป็นลำดับตาม Additives ที่เติม ได้ดังนี้ LC-10 $\simeq$ LP-15 > NaCl+LC-10, NaCl+LP-15 > NaCl > Control

Kung *et al.* (2000) รายงานถึงการเติม Ammonia-N (0.3%) หรือ Propionic acid preservative (0.3%) ลงในระหว่างกระบวนการผลิต Corn silage ทำให้จำนวนของยีสต์และราที่ปนเปื้อนใน Silage ลดลงอย่างรวดเร็ว จำนวนของ Enterobacteria ลดลงอย่างช้าๆ และไม่มีผลต่อจำนวนของ Lactic acid bacteria แต่มีการเจริญช้าลง เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิต Silage ที่ไม่เติมใดๆ (Control) การเติม Ammonia-N (0.3%) มีผลให้ค่า pH เพิ่มเป็นด่าง (ประมาณ 8-9) ในวันแรกของการเติมและลดลงเป็นกรด (ประมาณ 5-6) ในวันต่อมา และคงที่ประมาณ pH 4-4.5 ตลอดช่วงของการหมัก Corn silage ที่ได้จากการหมักนาน 106 วัน ชนิดที่เติม Ammonia-N และที่เติม Propionic acid preservative ทนต่อการเสียในสภาพมีออกซิเจน (Aerobic stability) ได้นานกว่า Control คือทนได้นาน 82, 69 และ 32.3 ชั่วโมง ตามลำดับ

จึงเห็นได้ว่ายังคงมีความต้องการด้านการปรับปรุงหรือหาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อ Silage แนวโน้มในการป้องกันการเสียของ Silage แนวทางหนึ่งที่น่าจะปฏิบัติได้คือ การใช้หัวเชื้อเพื่อผลิต Silage ที่สามารถผลิตสารนอกเหนือจากกรดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสียของ Silage รวมถึงจุลินทรีย์ก่อโรคกับสัตว์ที่ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และไม่มีผลข้างเคียงกับสัตว์ที่บริโภค สารที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สำคัญตามที่มีรายงานว่าผลิตจาก Lactic acid bacteria ได้แก่ Bacteriocins, Reuterin, Hydrogen peroxide, Diacetyl, Acetaldehyde, และ D-Isomers ของ Amino acids (Klaenhammer, 1988, 1993; Piard and Desmazeaud, 1991, 1992; Stiles and Hastings, 1991) ทั้งนี้ในปัจจุบันมีการใช้ Lactic acid bacteria ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (Safe bacteria; GRAS (Generally Regarded As Safe)) ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักอาหารของคนและสัตว์และการถนอมอาหาร และใช้ทั้งในสภาพ Natural microflora และ Starter cultures (Cintas *et al.*, 2001) รวมทั้งใช้ Bacteriocins ที่ผลิตจาก Lactic acid bacteria เป็นสารถนอมอาหารอยู่แล้ว (Hoover and Steenson, 1993) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Lactobacillus plantarum* หลายสายพันธุ์สามารถผลิต Plantacins หลายชนิดตามสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ซึ่ง Plantacins จัดเป็น Heat-stable bacteriocins ที่โดยส่วนใหญ่มีผลยับยั้งการเจริญพวก Gram-positive spoilage และ Food-borne pathogens โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Listeria monocytogenes* (West and Warner, 1988; Kato *et al.*, 1994; Jiménez-Díaz *et al.*, 1995; Diep *et al.*, 1996; Remiger *et al.*, 1999; Ehrmann *et al.*, 2000)

ในด้าน Probiotics ซึ่ง Fuller (1992, 1995) ได้ให้ความหมายไว้ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตชนิดเดียวหรือหลายชนิด หรือ Microbial stimulant ที่ให้กับคนหรือสัตว์เพื่อประโยชน์ในแง่การปรับปรุงสมบัติของ Indigenous microflora ให้ดีขึ้น ซึ่งส่งผลให้คนหรือสัตว์นั้นมีสุขภาพดีขึ้น ซึ่งในการผลิต Probiotics นั้นใช้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติสำคัญคือ เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถกระตุ้นการเจริญหรือช่วยสร้างความต้านทานต่อโรคของสัตว์ (host) ได้ เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคหรือสร้างสารพิษ

สามารถมีชีวิตอยู่รอดและเจริญ ทำให้พบในปริมาณมาก (มีความสามารถด้าน colonization) ในทางเดินอาหารของสัตว์ และสามารถเตรียมเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีชีวิตได้นานในระหว่างการเก็บเพื่อรอการใช้ประโยชน์ (Fuller, 1992)

จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ผลิต Probiotics กลุ่มสำคัญกลุ่มหนึ่งคือ Lactobacilli ที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งมีหลายสายพันธุ์และแต่ละสายพันธุ์ก็มีความจำเพาะต่อชนิดของสัตว์ด้วย *Lactobacillus* species อื่นที่มีรายงานการใช้อยู่บ้างเช่น *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *L. helviticus* (Fuller, 1992) การพัฒนาด้านการผลิต Probiotics ยังคงดำเนินอยู่ในปัจจุบัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการค้นหาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพเพื่อการใช้ประโยชน์กับสัตว์แต่ละชนิด (Fuller, 1992; Tannock, 1992)

Huber (1997) สรุปถึงประโยชน์ที่เป็นไปได้หลายประการของ Lactic acid bacteria ในกลุ่ม Lactobacilli และ Enterococci ที่ใช้เป็น Probiotics สำหรับโคกระบือ (cattle) ซึ่งได้แก่ (1) การเกาะติด (Adhesion) ของ Lactic acid bacteria กับผนังทางเดินอาหารของสัตว์ทำให้ป้องกันหรือขัดขวางการเกาะของแบคทีเรียก่อโรค (2) การเกิด Neutralization ของ Enterotoxins ซึ่งเกิดได้จากหลากหลายสาเหตุในระบบทางเดินอาหาร (3) การลดความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระบบทางเดินอาหาร ทำให้ยับยั้งการเพิ่มจำนวนอย่างมากมายของแบคทีเรียที่ให้โทษกับสัตว์ และ (4) การกระตุ้นการสังเคราะห์สารเฉพาะชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

สำหรับการศึกษาของโครงการวิจัยนี้ได้เน้นถึงการหาความหลากหลายของสายพันธุ์ของ Lactobacilli ที่พบใน Silage ที่ผลิตในประเทศไทยเพื่อใช้เป็นอาหารโค เพื่อเป็นข้อมูลของการศึกษาขั้นต่อไปที่จะเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ท้องถิ่นที่เหมาะสมในการผลิตหัวเชื้อ Silage สำหรับประเทศไทย เพื่อการผลิต Silage ที่คงคุณภาพ และติดตามการอยู่รอดและความสามารถด้าน colonization ของ Silage lactobacilli ในทางเดินอาหารของโค ซึ่งจะให้ประโยชน์ทั้งการผลิต Silage และผลทางด้าน Probiotics สำหรับโค

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อให้ได้ข้อมูลด้านความหลากหลายของสายพันธุ์ของ Lactobacilli ที่พบใน Silage ที่ผลิตในประเทศไทย

3. ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ของ Lactobacilli ที่พบใน Silage ที่ผลิตในประเทศไทยนี้ ได้ดำเนินการโดยเก็บรวบรวมตัวอย่าง Silage ซึ่งได้จากการหมักโดยอาศัยจุลินทรีย์จากธรรมชาติ จากแหล่งผลิตในประเทศไทย เพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์หา Lactobacilli และเลือกเก็บ Lactobacilli ตามลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่แตกต่างกันเพื่อการวิเคราะห์ชนิดโดยอาศัยสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียนั้น และศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์โดยใช้วิธีทางกรดนิวคลีอิค

4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ข้อมูลด้านสายพันธุ์ของ Lactobacilli ที่พบและที่พบปริมาณมากใน Silage ที่ได้จากการหมักตามธรรมชาติในประเทศไทย เพื่อเป็นพื้นฐานในการศึกษาถึงความสามารถในการอยู่รอดและ colonization ของ Silage lactobacilli ในทางเดินอาหารของโค ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับงานด้าน Microecology ของ Lactobacilli ที่มีความสำคัญและจำเป็นในการพัฒนาการผลิตผลผลิตทั้ง Silage และ Probiotics สำหรับสัตว์ในประเทศไทยอย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์แลคโตแบซิลลัสในหญ้าหมักหรือ Silage นี้ได้เริ่มดำเนินการโดยเก็บรวบรวมตัวอย่าง Silage จากแหล่งผลิตหลายแหล่งในจังหวัดสระบุรีและจังหวัดนครราชสีมา (ข้อ 2 และตารางที่ 3.1) และใช้สถานที่ปฏิบัติงานวิจัยคือ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา (อาคารเครื่องมือ 2) ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ (อาคารเครื่องมือ 3) และห้องปฏิบัติการชีวเคมี (อาคารเครื่องมือ 1) ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งใช้วัสดุและอุปกรณ์หลัก และมีวิธีดำเนินการดังนี้

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

1.1 ครุภัณฑ์

ครุภัณฑ์หลักที่ใช้มีดังต่อไปนี้ หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ตู้อบไอร้อน (Hot air oven) ตู้เขี่ยเชื้อ (จุลินทรีย์) (Laminar flow hood) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) 30 และ 37°ซ. ตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิต่ำ (4°ซ.) ตู้แช่แข็ง (Freezer) -20°ซ. เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance) เครื่องชั่งหยาบ (Pan balance) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) เครื่องนับโคโลนี (Colony counter) กล้องจุลทรรศน์ชนิดที่ใช้แสง (Light microscope) พร้อมกล้องถ่ายภาพ กล้องถ่ายภาพภาคสนาม เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Thermocycler หรือ GeneAmp PCR System) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) Refrigerated centrifuge Microcentrifuge Electrophoresis apparatus Micropipitte sets Spectrophotometer และ UV Transilluminator พร้อมกล้องถ่ายภาพ

1.2 วัสดุ

วัสดุที่ใช้มีดังต่อไปนี้ เครื่องแก้วพื้นฐานสำหรับปฏิบัติการจุลชีววิทยา หลอดแก้วสำหรับเก็บจุลินทรีย์ ขวดฝาเกลียวขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร ที่ทนความร้อนในการนึ่งฆ่าเชื้อ หญ้าหมักหรือ Silage ถัง (กล่อง) เก็บความเย็น ฟิล์มถ่ายภาพ กระดาษกรอง เยื่อกรอง (Membrane filter ที่มีขนาดช่องกรอง 0.2 ไมโครเมตร) Anaerobic jar และสารที่ทำปฏิกิริยากับออกซิเจน (เพื่อกำจัดออกซิเจน) Centrifuge tubes ขนาดบรรจุ 50 และ 250 มิลลิลิตร Microcentrifuge tubes Microtitre plates

Micropipette tips Sterile swab อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ สารเคมีสำหรับเตรียมสารละลายเพื่อวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacilli ทางสัณฐานวิทยาและปฏิกิริยาทางชีวเคมี สารเคมีและสารชีวภาพ เช่น Enzymes (โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Lysozyme, Mutanolysin, Pronase, Proteinase K, Ribonuclease, *Taq* DNA polymerase) Oligonucleotide primers และ Nucleoside triphosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) เพื่อวิเคราะห์สายพันธุ์ของ *Lactobacillus* ด้วยวิธีทางกรดนิวคลีอิค

2. การเก็บและรวบรวมตัวอย่าง Silage จากแหล่งผลิต

2.1 แหล่งผลิต Silage

ตัวอย่าง Silage ที่นำมาเพื่อตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacilli นั้น เป็น Silage ที่ได้จากกระบวนการหมักโดยธรรมชาติ (อาศัยจุลินทรีย์ที่มีอยู่หรือปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ) ซึ่งรวบรวมจากแหล่งผลิต Silage จำนวน 6 แหล่ง คือ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (งานทดลองที่ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิศิษฐิพร สุขสมบัติ ดำเนินการ) องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อสค.) (แหล่งผลิตในจังหวัดสระบุรีและจังหวัดนครราชสีมา) บริษัทแดรี่ ซัพพลาย แอนด์เซอร์วิส จำกัด (จังหวัดนครราชสีมา) ฟาร์มโชคชัย (จังหวัดนครราชสีมา) และฟาร์มมหาวิทยาลัยขอนแก่น (จังหวัดขอนแก่น)

2.2 วิธีการเก็บตัวอย่าง Silage

ใช้ปากคีบขนาดยาวประมาณ 1 ฟุต (ทำให้ปลอดเชื้อก่อนใช้ โดยจุ่มแอลกอฮอล์ (95%) แล้วผ่านเปลวไฟ ทิ้งให้เย็นประมาณ 15 วินาที ก่อนใช้งาน) คีบ Silage ให้ได้ประมาณ 500 กรัมต่อซ้ำต่อตัวอย่าง เก็บสองซ้ำ จากบ่อหมักหรือถังหมัก บรรจุตัวอย่าง Silage ลงในถุงพลาสติกใหม่และสะอาด รีดอากาศออกจากถุงบรรจุให้ได้มากที่สุด ปิดปากถุงให้สนิท และเก็บในถังเก็บความเย็น เพื่อนำมาวิเคราะห์หาแบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacilli ในห้องปฏิบัติการ

3. การวิเคราะห์หาแบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacilli ในตัวอย่าง Silage

3.1 การแยกและตรวจนับ Lactobacilli ในตัวอย่าง Silage

การแยกและตรวจนับ Lactobacilli ในตัวอย่าง Silage ดำเนินการตามวิธีนับมาตรฐาน (Standard plate count) ทางจุลชีววิทยา และใช้อาหาร Rogosa agar (Lactobacillus selective agar, ภาค

ผนวก ค3) โดยนำ Silage ปริมาณ 50 กรัม เจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อด้วยวิธี Serial dilution และเกลี่ย suspension ของเชื้อบนผิวหน้าอาหาร Rogosa agar ด้วย Spread plate technique (Woolford, 1994) ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 37°ซ. ในสภาพไร้ออกซิเจน (ใช้ Anaerobic jar และ Anaerocult A [MERCK, Merck KgaA, Germany]) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร บันทึกค่า CFU (Colony forming unit) โดยถือว่า 1 CFU เจริญมาจาก 1 เซลล์ พร้อมทั้งวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ Silage โดยเตรียมตัวอย่างเพื่อวัด ตามวิธีการของ Woolford (1994) ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, Mettler Delta 320, Mettler Toledo Ltd., England)

3.2 การเลือกเก็บโคโลนีของ Lactobacilli ที่แยกได้

เลือกเก็บ Lactobacilli ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน จากการแยกเชื้อข้อ 3.1 และแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) ด้วยวิธี Cross streak โดยใช้อาหาร MRS agar (ภาคผนวก ค1) และเลี้ยงให้แบคทีเรียเจริญที่อุณหภูมิ 37°ซ. ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียนั้นๆ และวิเคราะห์ความหลากหลายของสายพันธุ์ของ Lactobacilli ด้วยวิธีทางกรดนิวคลีอิค

การเก็บรักษาการมีชีวิตของเซลล์ ใน Stock culture ของแบคทีเรียที่รวบรวมได้ กระทำโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร MRS broth (ภาคผนวก ค1) ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย Skim milk ปลอดเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5% แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ.

4. การวิเคราะห์ชนิดของ Lactobacilli ที่แยกได้จาก Silage

การวิเคราะห์ชนิดของ Lactobacilli อาศัยสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียนั้นๆ ตาม Kandler and Weiss (1986) และ Holt *et al.* (1994)

4.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์โดยย้อมสีเซลล์แบคทีเรียแบบแกรม (Gram's stain)

การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์โดยย้อมสีเซลล์แบคทีเรียแบบแกรมนั้น ใช้แบคทีเรียที่คัดเลือกไว้และเลี้ยงให้เจริญบนอาหาร MRS agar (ภาคผนวก ค1) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาเตรียมรอย smear บนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด ตรึงเซลล์ให้ติดแผ่นแก้วสไลด์ด้วยความร้อน จากนั้นหยดสี Crystal violet

(ภาคผนวก ก1) ให้ท่วมรอย smear เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำเบาๆ ล้างน้ำออกด้วย Gram's iodine (ภาคผนวก ข3) และหยด Gram's iodine ให้ท่วมรอย smear เป็นเวลา 1 นาที เท Gram's iodine ทิ้ง และล้างรอย smear ด้วยแอลกอฮอล์ (95%) หรือ Acetone alcohol (ภาคผนวก ข1) จนไม่มีสีม่วงของ Crystal violet ออกมา แต่ไม่ควรเกิน 20 วินาที ล้างด้วยน้ำทันที ย้อมทับรอย smear ด้วยสี Safranin (ภาคผนวก ก2) เป็นเวลา 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ ทิ้งให้แห้ง แล้วตรวจดูรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า วัดขนาดของเซลล์ด้วย Ocular micrometer ซึ่งได้เทียบค่าแล้วจาก Stage micrometer

4.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรีย

คุณสมบัติทางชีวเคมีหลักของแบคทีเรียที่ได้ทดสอบเพื่อระบุชนิด คือ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ Catalase และ Oxidase และการทดสอบ Carbohydrate fermentation

4.2.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ Catalase

ใช้ Loop เขี่ยแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร MRS agar (ภาคผนวก ค1) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ป้ายบนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลาย Hydrogen peroxide (3%) (ภาคผนวก ข2) ลงบนเชื้อที่ป้ายไว้บนแผ่นแก้วสไลด์ ตรวจดูการเกิดฟองก๊าซ ซึ่งเป็นผลบวกของการสร้างเอนไซม์ Catalase

4.2.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ Oxidase

วางแผ่นกระดาษกรองลงในจานเลี้ยงเชื้อเปล่าที่สะอาด หยดสารละลาย Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (1%) (ภาคผนวก ข9) ลงบนกระดาษกรองให้พอเปียก ใช้ Loop เขี่ยแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร MRS agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ป้ายลงบนกระดาษกรองที่เปียกสารละลายสำหรับทดสอบ โดยขีดลากให้เป็นเส้นยาวประมาณ 3 เซนติเมตร ตรวจดูการเปลี่ยนสีของเชื้อที่ป้ายบนกระดาษกรอง ซึ่งถ้าเป็นผลบวกของการสร้างเอนไซม์ Oxidase เชื้อที่ป้ายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มภายใน 1 นาที

4.2.3 การทดสอบ Carbohydrate fermentation

การทดสอบ Carbohydrate fermentation เพื่อระบุ species ของ Lactobacilli ได้ดำเนินการตามวิธีของ New Zealand Dairy Research Institute (1995) ซึ่งได้พัฒนามาจาก Kandler and Weiss (1986) Carbohydrate ที่ใช้ทดสอบมีจำนวน 22 ชนิดคือ Amygdalin, L-Arabinose, Cellobiose, Esculin, Fructose,

Galactose, Glucose, Gluconate, Lactose, Maltose, Mannitol, Mannose, Melezitose, Melibiose, Raffinose, Rhamnose, Ribose, Salicin, Sorbitol, Sucrose, Trehalose และ Xylose ซึ่งเตรียมในรูปของสารละลาย (6.8% ในน้ำกลั่น) และทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรองโดยใช้เยื่อกรอง (ขนาดช่องกรอง 0.2 ไมโครเมตร) จากนั้นแบ่งบรรจุ Carbohydrate แต่ละชนิดลงในหลุมของ Microtitre plate ปลอดเชื้อหลุมละ 50 ไมโครลิตร ทำการทดลองสองซ้ำ เตรียมอาหาร MRS fermentation broth (ภาคผนวก ค2) และเตรียมแบคทีเรียเพื่อทดสอบ โดยเขี่ยโคโลนีของเชื้อบริสุทธิ์ อายุ 48 ชั่วโมง ที่เจริญบน MRS agar ใส่ลงใน MRS broth (ปริมาตร 3 มิลลิลิตร) บ่มให้แบคทีเรียเจริญเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสภาพไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 30°ซ. จากนั้นเกลี่ย (spread) เชื้ออายุ 18-24 ชั่วโมงนี้บนผิวหน้าอาหาร MRS agar ที่บรรจุในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มให้เชื้อเจริญบนผิวหน้าอาหารวุ้นที่อุณหภูมิ 30°ซ. ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ย้ายเชื้อจาก MRS agar plate ด้วย Sterile swab ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อเตรียม suspension ของเชื้อให้มีความขุ่นซึ่งเมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (A_{600}) ได้เท่ากับ 0.7 ซึ่งเทียบได้โดยประมาณเท่ากับ 4-6 McFarland unit suspension ปิเปต suspension ของเชื้อดังกล่าว 200 ไมโครลิตร ใส่ลงใน MRS fermentation broth ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และปิเปตส่วนผสมของเชื้อและอาหารนี้ 120 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมของ Microtitre plate ที่บรรจุ Carbohydrate 50 ไมโครลิตรไว้แล้ว ในขณะเดียวกันก็ตรวจสอบความสามารถในการสร้างก๊าซของเชื้อ โดยใส่เชื้อตามความขุ่นที่เตรียมได้ลงในหลอดบรรจุ MRS broth ที่มี Durham tube อยู่ด้วย บ่มให้แบคทีเรียทั้งใน Microtitre plate และหลอด MRS broth เจริญที่อุณหภูมิ 30°ซ. ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตรวจผลการสร้างกรดในอาหารที่บรรจุ Carbohydrate ชนิดต่างๆ ใน Microtitre plate โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของ MRS fermentation medium จากสีม่วงเป็นสีเหลือง บันทึกผล + (สีเหลือง) และผล – (สีม่วง) และตรวจความสามารถในการสร้างก๊าซของเชื้อจากช่องว่างใน Durham tube ในหลอดบรรจุ MRS broth เทียบผลของการระบุชนิดของ Lactobacilli ที่แยกได้จาก Silage จากตารางการทดสอบเชื้ออ้างอิง (New Zealand Dairy Research Institute, 1995)

5. การศึกษาความหลากหลายสายพันธุ์ของ Lactobacilli ที่แยกจาก Silage โดยใช้วิธีทางกรดนิวคลีอิค

การศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ของ Lactobacilli ที่แยกได้ด้วยวิธีทางกรดนิวคลีอิคนั้น ได้เริ่มใช้วิธี Ribotyping (Rodtong and Tannock, 1993) และเนื่องจากปัญหากระแสไฟฟ้าที่อาคารเครื่องมือ 2 ที่ใช้ปฏิบัติงานเป็นหลัก ดับบ่อยครั้งและช่วงเวลานานพอที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของ

วัสดุชีวภาพที่จำเป็นต้องใช้ และด้วยความช่วยเหลือด้านวัสดุและอุปกรณ์ของ Professor Gerald W. Tannock สังกัดภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัย Otago ประเทศนิวซีแลนด์ ที่ปรึกษาของโครงการวิจัย จึงได้พัฒนาวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ขึ้นเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายของสายพันธุ์ของ Lactobacilli แทนวิธี Ribotyping ซึ่งการวิเคราะห์ความหลากหลายของสายพันธุ์ของ Lactobacilli ด้วยวิธี RAPD นี้ อาศัยการเพิ่มปริมาณ DNA (Genomic DNA) ของแบคทีเรียด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ขั้นตอนของวิธี RAPD ที่ได้ดำเนินการมีดังนี้

5.1 การสกัดหรือแยก Genomic DNA จากเซลล์ของ Lactobacilli

การสกัดหรือแยก Genomic DNA จากเซลล์ของ Lactobacilli นั้นได้ดำเนินการตามวิธีของ Luchansky *et al.* (1991) ซึ่งเป็นวิธีที่ทำให้ได้ปริมาณ DNA มากเพียงพอสำหรับการย่อยของ Restriction endonucleases สำหรับวิธี Ribotyping ตามที่ได้วางแผนและเตรียมวัสดุและอุปกรณ์ไว้ในเบื้องต้น ซึ่ง DNA ที่ได้นี้มีปริมาณมากเกินพอสำหรับวิธี RAPD การสกัด DNA กระทำโดยนำเชื้อบริสุทธิ์ของ Lactobacillus ที่เลี้ยงใน MRS broth (ภาคผนวก ค1) เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำเซลล์ที่ได้ทั้งหมดไปเลี้ยงต่อใน MRS broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นแยกเช่นเดียวกับข้างต้น ล้างเซลล์สองครั้งด้วย TES buffer (ภาคผนวก ข8) เติม Lysis buffer (ภาคผนวก ข5) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ที่มี Lysozyme (SIGMA, Sigma Chemical Co., USA) 20 มิลลิกรัม และ Mutanolysin (SIGMA) 40 ไมโครกรัม เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย บ่มเซลล์ใน Lysis buffer ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 0.25 M Ethylenediaminetetracetic acid (EDTA, pH 8.0) 1 มิลลิลิตร วางหลอดบรรจุส่วนผสมของเซลล์และสารละลายที่เติมไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที แล้วเติมสารละลาย Sodium dodecyl sulfate (SDS, 20% w/v) 400 ไมโครลิตร นำไปแช่ใน Water bath อุณหภูมิ 65°ซ. จนได้ส่วนผสมที่ใส (ประมาณ 15 นาที) เติมสารละลาย Proteinase K (MERCK, Merck KgaA, Germany) (20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 10 mM Tris-HCl-pH 8.0/1% SDS) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร นำหลอดบรรจุส่วนผสมกลับไปแช่ใน Water bath อุณหภูมิ 65°ซ. อีกครั้งเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาแล้วเติม Proteinase K buffer (10 mM Tris-HCl-pH 8.0/1% SDS) ที่มี Pronase (Pronase E, MERCK) 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 9 มิลลิลิตร บ่มส่วนผสมต่อที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นสกัดด้วย Phenol และ Chloroform แล้วตกตะกอน DNA ด้วยการเติม 2 เท่าโดยปริมาตรของ Absolute ethanol เก็บเกี่ยวตะกอน DNA ที่ได้โดยการปั่นแยกด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วย Ethanol (70%) ทิ้งให้ตะกอนแห้ง

(ประมาณ 30 นาที) แล้วจึงละลายตะกอน DNA ใน TE buffer (ภาคผนวก ข7) เก็บสารละลาย DNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ. เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ตรวจสอบความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้ก่อนนำไปใช้ โดยเปรียบเทียบกับ DNA ที่ทราบความเข้มข้นแล้วด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis แทนการวัดด้วย Spectrophotometer เนื่องจากข้อจำกัดของครุภัณฑ์ที่มีอยู่แล้วในการปฏิบัติงานวิจัย และถ้าพบ RNA ปนเปื้อนอยู่ในปริมาณสูง กำจัด RNA ออกโดยใช้สารละลาย RNase (Ribonuclease A, SIGMA) (Sambrook *et al.*, 1989)

5.2 การเพิ่มปริมาณ Genomic DNA ของ Lactobacilli ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) สำหรับวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ที่ได้พัฒนาเพื่อระบุความแตกต่างของ *Lactobacillus* strains ที่พบใน Silage เริ่มจากการทดลองเปรียบเทียบ 3 วิธีการ เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมที่สุดสำหรับแบคทีเรียเป้าหมาย วิธีการดังกล่าวคือ

ก) วิธีการตาม Cocconcelli *et al.* (1995) ซึ่งมีขั้นตอนที่ได้ดัดแปลงมาศึกษาดังนี้

เตรียม PCR reaction mixture ในหลอดที่มีฝาปิด ขนาดบรรจุ 200 ไมโครลิตร โดยบรรจุ PCR reaction mixture ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ 1X PCR buffer (2 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 100 ไมโครกรัม (μg) ต่อไมโครลิตร Gelatin และ 10 mM Tris base, pH 8.3) 50 ไมโครโมล (μM) ของแต่ละชนิดของ Nucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Boehringer Mannheim, Boehringer Mannheim GmbH, Germany) 2 ไมโครโมล ของ Random primer (5'-AGCAGCGTGG-3') 2 หน่วย (Units) ของ *Taq* DNA polymerase (QIAGEN, QIAGEN GmbH, Germany) และ 100 นาโนกรัม (ng) ของ Genomic DNA และใช้กระบวนการเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ GeneAmp™ PCR System 9800 (Perkin-Elmer, PerkinElmer, Inc., USA) จำนวน 45 รอบ โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาต่างกันตามลำดับ ดังนี้ (1) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ. เป็นเวลา 1 นาที (2) รอบที่ 1-45 โดยแต่ละรอบประกอบด้วย Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ. เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิ 29°ซ. เป็นเวลา 1.5 นาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 1.5 นาที และ (3) Extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 10 นาที

ข) วิธีการตาม Quere *et al.* (1997) ซึ่งมีขั้นตอนที่ได้ดัดแปลงมาศึกษาดังนี้

เตรียม PCR reaction mixture ในหลอดที่มีฝาปิด ขนาดบรรจุ 200 ไมโครลิตร โดยบรรจุ PCR reaction mixture ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ 1X PCR buffer (ที่มี 1.5 mM $MgCl_2$; QIAGEN) 100 ไมโครโมล ของแต่ละชนิดของ Nucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Boehringer Mannheim) 10 พิโคโมล ของ OPA3 primer (5'-AGTCAGCCAC-3') 1 หน่วย ของ

Taq DNA polymerase (QIAGEN) และ 100 นาโนกรัม ของ Genomic DNA และใช้กระบวนการเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ GeneAmp™ PCR System 9800 (Perkin-Elmer) จำนวน 45 รอบ โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาตามลำดับ ดังนี้ (1) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ. เป็นเวลา 5 นาที (2) รอบที่ 1-45 โดยแต่ละรอบประกอบด้วย Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 36°ซ. เป็นเวลา 1 นาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 1 นาที และ (3) Extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 10 นาที

ค) วิธีการที่กำหนดขึ้นโดยยึดตาม RAPD Analysis Primers ที่เลือกจากผู้ผลิต (RAPD Analysis Primer Set, Pharmacia Biotech, Sweden)

โดยเตรียม PCR reaction mixture ในหลอดที่มีฝาปิด ขนาดบรรจุ 200 ไมโครลิตร โดยบรรจุ PCR reaction mixture ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ 1X PCR buffer ที่มี 1.5 mM $MgCl_2$ (QIAGEN) 100 ไมโครโมล ของแต่ละชนิดของ Nucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Boehringer Mannheim) 20 พิโคโมล ของ Primer 2 หรือ Primer 3 (RAPD Analysis Primer Set, Pharmacia Biotech, Sweden; ตารางที่ 2.1) 2 หน่วย ของ *Taq* DNA polymerase (QIAGEN) และ 100 นาโนกรัม ของ Genomic DNA และใช้กระบวนการเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ GeneAmp™ PCR System 9800 (Perkin-Elmer) จำนวน 40 รอบ โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาตามลำดับ ดังนี้ (1) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ. เป็นเวลา 2 นาที (2) รอบที่ 1-40 โดยแต่ละรอบประกอบด้วย Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ. เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิ 29°ซ. เป็นเวลา 1 นาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 1 นาที และ (3) Extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 2.1 RAPD Analysis Primers (RAPD Analysis Primer Set, Pharmacia Biotech, Sweden) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ *Lactobacillus* strains ด้วยวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

Primer	**Sequence (5′–3′)**
Primer 2	GTTTCGCTCC
Primer 3	GTAGACCCGT

5.3 การตรวจวิเคราะห์ผลผลิต DNA จากกระบวนการ PCR ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

ตรวจวิเคราะห์ผลผลิต DNA จากของเหลวที่ผ่านกระบวนการ PCR โดยใช้ของเหลวปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ Loading buffer (ภาคผนวก ข4) 2 ไมโครลิตร แล้วบรรจุลงในช่อง (Well) ของ Agarose gel (1.5%; Low EEO Agarose, BIO 101, Inc., USA) ในสารละลาย TBE (ภาคผนวก ข6) ใช้ 100 bp DNA ladder (Boehringer Mannheim) และ 100 bp DNA ladder (GIBCOBRL, Life Technologies, USA) เป็น DNA Molecular weight markers แยกชิ้นของ DNA ตามขนาดด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 50 โวลท์ จากนั้นตรวจหาตำแหน่งของแถบ DNA (DNA band) โดยย้อม Agarose gel ด้วย Ethidium bromide (เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 15 นาที และตรวจดูการเรืองแสงของแถบ DNA ภายใต้แสงอัลตร้า-ไวโอเลต ที่ความยาวช่วงคลื่น 295 นาโนเมตร ของ UV Transilluminator บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ

5.4 สรุปแบบแผน RAPD ของ Lactobacilli

สรุปแบบแผน RAPD ของ Lactobacilli สายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้จากการตรวจหาผลผลิต DNA จากกระบวนการ PCR ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับ Type culture strains และความสอดคล้องกับผลการระบุชนิดของ Lactobacilli โดยอาศัยสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียนั้น (ข้อ 4)

บทที่ 3
ผลการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ของ Lactobacilli ที่พบใน Silage ที่ผลิตในประเทศไทยนี้ ได้ดำเนินการโดยเก็บรวบรวมตัวอย่าง Silage จากแหล่งผลิตในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และตรวจวิเคราะห์หา Lactobacilli ซึ่งได้ผลการวิจัยดังนี้

1. ตัวอย่าง Silage ที่รวบรวมได้จากแหล่งผลิต

ตัวอย่าง Silage ที่นำมาเพื่อตรวจวิเคราะห์หาแบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacilli ในการศึกษาครั้งนี้ เป็น Silage ที่ได้จากกระบวนการหมักโดยธรรมชาติ (อาศัยจุลินทรีย์ที่มีอยู่หรือปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ) ซึ่งรวบรวมจากแหล่งผลิต Silage จำนวน 6 แหล่ง ในจังหวัดสระบุรี นครราชสีมา และขอนแก่น (ตารางที่ 3.1) จำนวนตัวอย่าง Silage ที่รวบรวมได้มีทั้งสิ้น 27 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.2 และ 3.3) และ Silage ที่ได้นี้แตกต่างกันตามพืชวัตถุดิบที่ใช้ผลิต ซึ่งมี 3 ชนิดหลัก คือ

(1) Sorghum silage

ใช้ข้าวฟ่างชนิดที่เป็นพืชอาหารสัตว์เป็นวัตถุดิบในการผลิต และผลิตในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เป็น Silage ที่วัตถุดิบผ่านการหมักในถุงพลาสติกหนาสองชั้นที่บรรจุวัสดุหมักปริมาณ 16 กิโลกรัมต่อถุง นาน 1 เดือน และมีทั้งที่ได้จากการหมักที่เติมและไม่เติมกากน้ำตาล ซึ่งเมื่อสังเกตลักษณะทางกายภาพแล้ว ทั้งตัวอย่างที่ได้จากการหมักที่เติมหรือไม่เติมกากน้ำตาลมีลักษณะเช่นเดียวกัน ตัวอย่างลักษณะของ Sorghum silage ดังแสดงในรูปที่ 3.1ก แต่ถ้าเปรียบเทียบจากกลิ่นพบว่าเฉพาะ Silage ที่ได้จากการหมักโดยเติมกากน้ำตาลมีกลิ่นหอมของการหมัก นอกจากนี้ ยังได้รับตัวอย่าง Sorghum silage ที่ทดลองผลิตจาก Forage sorghum ต่างสายพันธุ์กัน 4 สายพันธุ์ (Suksombat, 1997; ตารางที่ 3.3) คือ Jumbo (Sorghum x Sudan Hybrid), Nectar (Sweet sorghum x Sudan Hybrid), Superdan (Sudan x Sudan Hybrid) และ Sugargraze (Sweet sorghum x Sweet sorghum) ที่ผ่านการหมักและมีลักษณะทางกายภาพทำนองเดียวกับ Sorghum silage สองตัวอย่างข้างต้น

(2) Grass silage

ใช้หญ้าเป็นวัตถุดิบในการผลิตและได้จากแหล่งผลิตทั้ง 5 แหล่ง (ตารางที่ 3.1) ซึ่ง Grass silage ที่ได้จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เป็นตัวอย่าง Silage ที่ทดลองผลิตจากหญ้า 2 สายพันธุ์ (Suksombat, 1997; ตารางที่ 3.3) คือ Nutrifeed (Forage pennisetum) และ Ruzi grass (*Brachiaria ruziziensis*) และผ่านการหมักในถุงพลาสติกหนาสองชั้นที่บรรจุวัสดุหมัก 16 กิโลกรัม

ต่อถุง เป็นเวลา 1 เดือน ในขณะที่ Grass silage ที่ได้จากองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อสค.) (อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา) ผ่านการหมักในบ่อดิน ขนาดบรรจุ 1000 ตัน จำนวน 2 บ่อ คือที่หมักได้ 1 เดือน (ยังไม่ได้เปิดบ่อหมักเพื่อนำผลิตภัณฑ์ไปใช้ประโยชน์) และหมักข้ามปี (กำลังอยู่ในระหว่างการใช้ประโยชน์ ซึ่งได้ใช้ผลิตภัณฑ์ไปแล้วราว 1 ใน 3 ของบ่อหมัก) ตัวอย่างลักษณะของ Grass silage ข้างต้นดังแสดงในรูปที่ 3.1ข และ 3.1ค ตามลำดับ ส่วน Grass silage ที่ได้จาก อสค. (อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี) ผ่านการหมักในบ่อซีเมนต์ ขนาดบรรจุ 300 ตัน ซึ่งใช้ประโยชน์ผลิตภัณฑ์ไปแล้วจนถึงส่วนล่างของบ่อ ตัวอย่าง Grass silage ที่เก็บได้มีสีคล้ำ (รูปที่ 3.1ง) มากกว่าตัวอย่าง ที่ได้จากบ่อหมักที่อำเภอปากช่อง (รูปที่ 3.1ข และ 3.1ค) และ Grass silage ที่ได้จากฟาร์มโชคชัย มีทั้งที่ได้จากการหมักในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ ขนาดบรรจุประมาณ 700 ตันต่อบ่อ ซึ่งใช้ประโยชน์จนถึงส่วนล่างของบ่อ ตัวอย่าง Silage ที่เก็บได้มีสีคล้ำเช่นเดียวกับ Silage ที่ได้จาก อสค. (อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี) สำหรับ Grass silage ที่ได้จากฟาร์มมหาวิทยาลัยขอนแก่น (อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น) เป็นงานทดลองผลิตหญ้าหมักจาก Ruzi grass ซึ่งหมักได้ 45 วัน ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นหอมของการหมักและมีลักษณะคล้ายตัวอย่างที่เก็บจากบ่อหมักที่หมักได้ 1 เดือน ของ อสค. ที่อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

(3) Corn silage

ตัวอย่าง Corn silage ที่ได้ มาจากการผลิตที่ใช้ทั้งเปลือกหรือส่วนที่ห่อหุ้มฝักและซังของข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ ผลิตจากบริษัทแดรี่ ซัพพลาย แอนด์เซอร์วิส จำกัด และเป็น Silage ที่วัตถุดิบผ่านการหมักในถุงพลาสติกหนาสองชั้นที่บรรจุวัสดุหมักประมาณ 2 ตันต่อถุง เป็นเวลา 21 วัน ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นหอมของการหมัก และมีลักษณะทางกายภาพดี (รูปที่ 3.1จ)

ตารางที่ 3.1 แหล่งผลิต Silage ที่ได้รับความอนุเคราะห์ให้นำตัวอย่าง Silage มาวิเคราะห์หาแบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacilli

แหล่งผลิต Silage	สถานที่ตั้ง	ชนิดของ Silage	ลักษณะของบ่อหมัก
1. ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (ได้รับจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิศิษฐิพร สุขสมบัติ)	อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา	1) Sorghum silage เป็นข้าวฟ่าง (พืชอาหารสัตว์) หมัก 2) Grass silage (Forage pennisetum และ Ruzi grass)	ถุงพลาสติกหนา บรรจุวัสดุหมัก 16 กิโลกรัมต่อถุง
2. องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อสค.)	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา	Grass silage	บ่อดิน ขนาดบรรจุ 1000 ตัน
3. องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อสค.)	อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี	Grass silage	บ่อซีเมนต์ ขนาดบรรจุ 300 ตัน
4. บริษัทแดรี่ ซัพพลาย แอนด์เซอร์วิส จำกัด	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา	Corn silage (เปลือกหรือส่วนที่ห่อหุ้มฝักและซังข้าวโพด)	ถุงพลาสติกสองชั้น ขนาดบรรจุประมาณ 2 ตันต่อถุง
5. ฟาร์มโชคชัย	อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา	Grass silage	บ่อซีเมนต์และบ่อดิน ขนาดบรรจุประมาณ 700 ตันต่อบ่อ
6. ฟาร์มมหาวิทยาลัยขอนแก่น	อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น	Grass silage (Ruzi grass)	งานทดลองหญ้าหมัก ไม่ได้ประมาณภาชนะบรรจุและปริมาณ

(ก)

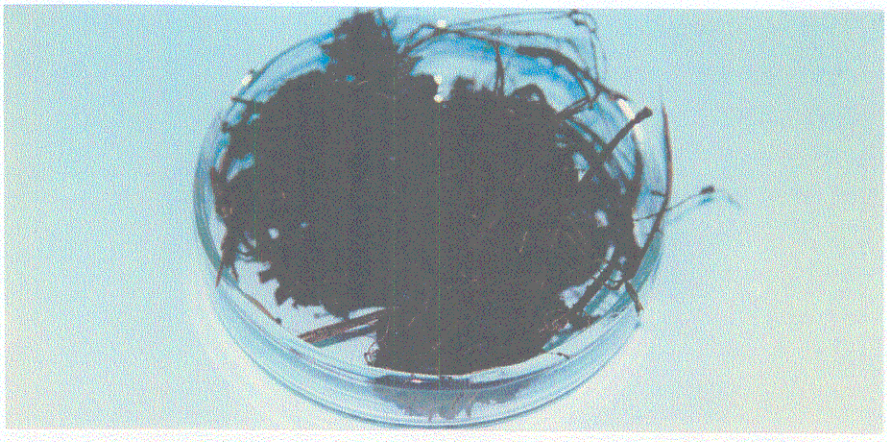
(ข)

(ค)

รูปที่ 3.1 ตัวอย่าง Silage ที่เก็บจากแหล่งผลิต:

(ก) Sorghum silage ที่หมักได้ 1 เดือน จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา

(ข) และ (ค) Grass silage ที่หมักได้ 1 เดือนและ หมักข้ามปี (กำลังอยู่ระหว่างการใช้ประโยชน์) ตามลำดับ จากบ่อหมัก (บ่อดิน) ขององค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา



(ง)

(จ)

รูปที่ 3.1 ตัวอย่าง Silage ที่เก็บจากแหล่งผลิต:

(ต่อ) (ง) Grass silage จากบ่อหมัก (บ่อซีเมนต์) ที่เปิดบ่อเพื่อนำ Silage มาใช้ประโยชน์จนถึงส่วนล่างของบ่อหมัก ขององค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี

(จ) Corn silage ที่หมักได้ 21 วัน จากบริษัทแดรี่ ซัพพลาย แอนด์เซอร์วิส จำกัด อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

2. ผลการวิเคราะห์หาแบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacilli ในตัวอย่าง Silage

2.1 ผลการแยกและตรวจนับ Lactobacilli ในตัวอย่าง Silage

เมื่อนำ Silage 3 ชนิดหลัก คือ Sorghum silage, Grass silage และ Corn silage ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งผลิต 6 แหล่ง จำนวนทั้งสิ้น 27 ตัวอย่าง (แต่ละตัวอย่างเก็บสองซ้ำ) มาแยกและตรวจนับปริมาณ Lactobacilli โดยวิธีนับมาตรฐาน (Standard plate count) และใช้อาหาร Rogosa agar (Lactobacillus selective agar) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ. ในสภาพไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พร้อมทั้งวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของทุกตัวอย่าง พบว่าปริมาณ Lactobacilli ใน Sorghum silage และ Grass silage โดยเฉลี่ยใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วง 10^5 ถึง 10^7 CFU/กรัมของ Silage (น้ำหนักเปียก) มีบางตัวอย่างที่พบปริมาณ Lactobacilli สูงสุดซึ่งประมาณ 10^8 CFU/กรัมของ Silage คือ ตัวอย่าง Sorghum silage (ใช้ Forage sorghum พันธุ์ Jumbo และ Superdan เป็นวัตถุดิบ) ที่ได้จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (1.03×10^8 และ 1.45×10^8 CFU/กรัม ตามลำดับ) และ Grass silage (ใช้ Forage pennisetum เป็นวัตถุดิบ) ที่ได้จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (1.06×10^8 CFU/กรัม) (ตารางที่ 3.2 และ 3.3) สำหรับ Corn silage ที่ได้จากบริษัทแดรี่ ซัพพลาย แอนด์เซอร์วิส จำกัด พบปริมาณ Lactobacilli โดยเฉลี่ย 1.07×10^8 CFU/กรัม (ตารางที่ 3.2) ส่วนความเป็นกรด-ด่างในทุกชนิดของ Silage มีค่าแตกต่างกันในช่วงกว้างคือ 4.0 ถึง 8.0 (ตารางที่ 3.2 และ 3.3)

ตารางที่ 3.2 ปริมาณ Lactobacilli ที่ตรวจพบในตัวอย่าง Silage จำนวนไอโซเลทของ Lactobacilli ที่เลือกเก็บเพื่อศึกษาชนิดและสายพันธุ์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของตัวอย่าง Silage ที่เก็บจากแหล่งผลิต 6 แหล่งในประเทศไทย

แหล่งผลิต	ประเภทของ Silage	จำนวน Lactobacilli (CFU*/กรัมน้ำหนักเปียก)	จำนวนไอโซเลทที่เลือกเก็บเพื่อศึกษาชนิดและสายพันธุ์	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)
1. ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (ได้รับจาก ผศ. ดร. วิศิษฐิพร สุขสมบัติ)	Sorghum silage			
	1) จากการหมักที่เติมกากน้ำตาล	4.96×10^6	16	4.14
	2) จากการหมักที่ไม่เติมกากน้ำตาล	4.32×10^7	26	4.36
2. องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อสค.)				
2.1 อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา	Grass silage			
	1) หมัก 1 เดือน	3.12×10^5	30	6.17
	2) หมักข้ามปี (กำลังใช้ประโยชน์)	1.33×10^6	30	7.25
2.2 อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี	Grass silage (ใช้ประโยชน์จนถึงส่วนล่างของบ่อหมัก)	6.78×10^5	36	8.60
3. บริษัทแดรี่ ซัพพลาย แอนด์เซอร์วิส จำกัด อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา	Corn silage	1.07×10^8	35	3.99

* CFU = Colony forming unit โดยถือว่า 1 CFU เจริญมาจาก 1 เซลล์

ตารางที่ 3.2 *(ต่อ)*

แหล่งผลิต	ประเภทของ Silage	จำนวน Lactobacilli (CFU*/กรัมน้ำหนักเปียก)	จำนวนไอโซเลทที่เลือกเก็บเพื่อศึกษาชนิดและสายพันธุ์	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)
4. ฟาร์มโชคชัย อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา	Grass silage 1) จากบ่อดิน 2) จากบ่อซีเมนต์ (ใช้ประโยชน์จนถึงส่วนล่างของบ่อหมักของทั้งสองบ่อ)	7.05×10^4 1.58×10^5	25 20	7.92 7.52
5. ฟาร์มมหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น	Grass silage (Ruzi grass)	6.50×10^6	22	4.50

* CFU = Colony forming unit โดยถือว่า 1 CFU เจริญมาจาก 1 เซลล์

ตารางที่ 3.3 ปริมาณ Lactobacilli ที่ตรวจพบในตัวอย่าง Silage จำนวนไอโซเลทของ Lactobacilli ที่เลือกเก็บเพื่อศึกษาชนิดและสายพันธุ์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของตัวอย่าง Silage ที่ทดลองผลิตจากพืชอาหารสัตว์ต่างสายพันธุ์ จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สายพันธุ์ของพืชที่ใช้ผลิต Silage[1]/ชุดที่ผลิต	จำนวน Lactobacilli (CFU[2]/กรัมน้ำหนักเปียก)	จำนวนไอโซเลทที่เลือกเก็บ	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	ข้อสังเกต
Forage pennisetum: Nutrifeed/				
1) NF41	1.06×10^8	10	4.88	โคโลนีของแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่มีลักษณะกลม (Circular) นูน (Convex) ขอบเรียบ (Entire) สีขาวขุ่น และมีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 3-4 มิลลิเมตร ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นหอมของการหมัก
2) NF42	1.30×10^7	8	7.90	โคโลนีที่พบมีหลายขนาดและลักษณะ ส่วนใหญ่มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่น และบางโคโลนีค่อนข้างโปร่งแสง โคโลนีที่มีขนาดใหญ่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4-6 มิลลิเมตร และขนาดเล็กมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร ซึ่งประมาณ 60% ของโคโลนีที่พบมีขนาดเล็ก
3) NF43	6.85×10^7	9	5.84	โคโลนีที่พบส่วนใหญ่มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่น และมีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 3-4 มิลลิเมตร ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นหอมของการหมัก
Ruzi grass/				
1) RZ41	8.40×10^7	7	5.72	โคโลนีที่พบส่วนใหญ่มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่น และมีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 3-4 มิลลิเมตร

[1] Suksombat (1997)

[2] CFU = Colony forming unit โดยถือว่า 1 CFU เจริญมาจาก 1 เซลล์

ตารางที่ 3.3 *(ต่อ)*

สายพันธุ์ของพืชที่ใช้ผลิต Silage[1]/ชุดที่ผลิต	จำนวน Lactobacilli (CFU[2]/กรัมน้ำหนักเปียก)	จำนวนไอโซเลทที่เลือกเก็บ	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	ข้อสังเกต
2) RZ42	8.80×10^6	4	7.96	โคโลนีที่พบมีหลายขนาดและลักษณะทั้งกลม นูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่น และบางโคโลนีค่อนข้างโปร่งแสง โคโลนีที่มีขนาดใหญ่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4-6 มิลลิเมตร และขนาดเล็กมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร
3) RZ43	9.50×10^5	4	8.24	พบโคโลนีขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร) ประมาณ 80% ที่เหลือเป็นโคโลนีขนาดกลาง (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร)
Forage sorghum:				
Jumbo/				
1) JB41	8.05×10^6	7	8.05	โคโลนีที่พบส่วนใหญ่มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่น และมีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 3-4 มิลลิเมตร
2) JB42	1.03×10^8	10	4.28	โคโลนีที่พบส่วนใหญ่มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่น และมีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 3-4 มิลลิเมตร ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นหอมของการหมัก
3) JB43	7.35×10^6	7	7.71	โคโลนีที่พบส่วนใหญ่มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่น และมีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 3-4 มิลลิเมตร

[1] Suksombat (1997)

[2] CFU = Colony forming unit โดยถือว่า 1 CFU เจริญมาจาก 1 เซลล์

ตารางที่ 3.3 *(ต่อ)*

สายพันธุ์ของพืชที่ใช้ผลิต Silage[1]/ชุดที่ผลิต	จำนวน Lactobacilli (CFU[2]/กรัมน้ำหนักเปียก)	จำนวนไอโซเลทที่เลือกเก็บ	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	ข้อสังเกต
Forage sorghum:				
Nectar/				
1) NT41	1.30×10^4	4	8.00	โคโลนีที่พบส่วนใหญ่มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ และมีขนาดเล็กทั้งหมด (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร)
2) NT42	6.50×10^3	6	8.08	พบทั้งโคโลนีขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร) และขนาดกลาง (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-4 มิลลิเมตร)
3) NT43	4.55×10^7	9	4.74	โคโลนีที่พบมีทั้งลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่น เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 3-4 มิลลิเมตร และโคโลนีขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร) ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นหอมของการหมัก
Forage sorghum:				
Superdan/				
1) SD41	7.45×10^7	7	7.36	โคโลนีของเชื้อที่พบมีหลายขนาดและลักษณะส่วนใหญ่มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่น และบางโคโลนีค่อนข้างโปร่งแสง โคโลนีที่มีขนาดใหญ่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4-6 มิลลิเมตร และขนาดเล็กมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร

[1] Suksombat (1997)

[2] CFU = Colony forming unit โดยถือว่า 1 CFU เจริญมาจาก 1 เซลล์

ตารางที่ 3.3 *(ต่อ)*

สายพันธุ์ของพืชที่ใช้ผลิต Silage[1]/ชุดที่ผลิต	จำนวน Lactobacilli (CFU[2]/กรัมน้ำหนักเปียก)	จำนวนไอโซเลทที่เลือกเก็บ	ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	ข้อสังเกต
2) SD42	$1.45x10^8$	10	7.10	โคโลนีที่พบส่วนใหญ่มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่น และมีเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 3-4 มิลลิเมตร ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นหอมของการหมัก
3) SD43	$6.75x10^5$	6	7.95	โคโลนีของแบคทีเรียที่พบมีหลายขนาดและลักษณะแตกต่างกันมาก ซึ่งมีทั้งโคโลนีกลม สีขาวขุ่น ขนาดใหญ่ (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4-6 มิลลิเมตร) ราว 70% และที่เหลือโดยเฉลี่ยเป็นโคโลนีทึบแสงขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร)
Forage sorghum:				
Sugargraze/				
1) SG41	$1.25x10^4$	6	7.90	ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นเหม็นเน่า โคโลนีของแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่มีขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร)
2) SG42	$2.20x10^4$	7	8.01	โคโลนีที่พบส่วนใหญ่มีขนาดใหญ่ (เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 4-6 มิลลิเมตร)
3) SG43	$4.75x10^7$	9	7.18	ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นหอมของกรด โคโลนีของแบคทีเรียที่พบมีหลายลักษณะ ส่วนใหญ่มีลักษณะกลม นูน ขอบเรียบ สีขาวขุ่น และบางโคโลนีค่อนข้างโปร่งแสง และประมาณ 50% เป็นโคโลนีที่มีขนาดใหญ่ (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4-6 มิลลิเมตร) ที่เหลือเป็นโคโลนีที่มีขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร)

[1] Suksombat (1997)

[2] CFU = Colony forming unit โดยถือว่า 1 CFU เจริญมาจาก 1 เซลล์

2.2 การเก็บโคโลนีของ Lactobacilli ที่แยกได้

เลือกเก็บ Lactobacilli ตามลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่แตกต่างกันได้ทั้งสิ้น 370 ไอโซเลท (Isolates) (ตารางที่ 3.2 และ 3.3) โคโลนีของ Lactobacilli ที่พบโดยส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายคลึงกันจากทุกตัวอย่าง Silage (ตัวอย่างลักษณะโคโลนีของ Lactobacilli ที่พบดังแสดงในรูปที่ 3.2) จากนั้นแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) และวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรีย และความหลากหลายของสายพันธุ์ของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว

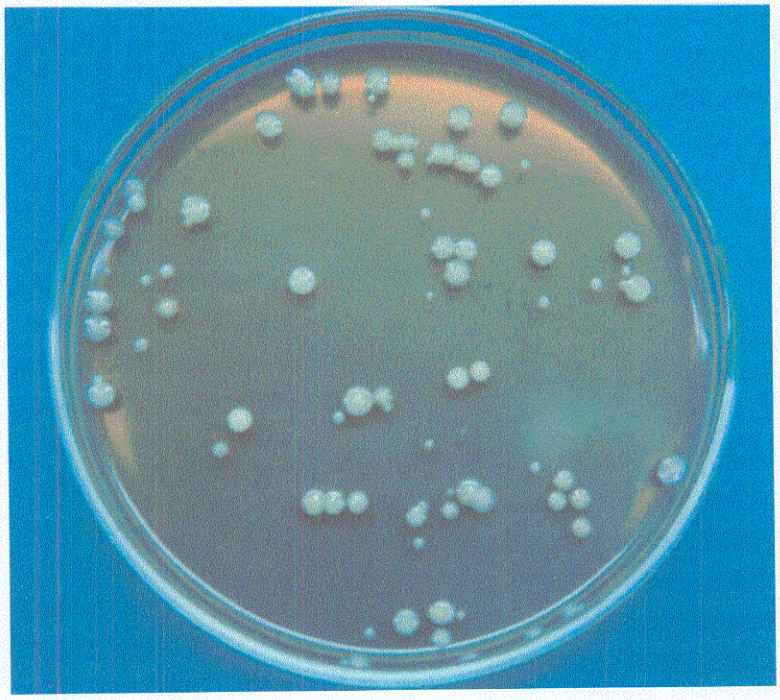
3. ผลการวิเคราะห์ชนิดของ Lactobacilli ที่แยกได้จาก Silage โดยอาศัยสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรีย

Lactobacilli เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อน (Rod) สร้างกรดแลคติกเป็นผลผลิตหลักในการเจริญ พบทั้งที่เป็น Anaerobes และ Microaerophiles และอาจพบ Facultative anaerobes ซึ่งโดยปกติเป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้างเอนไซม์ Catalase แต่บางสายพันธุ์อาจสร้าง Pseudocatalase และการทดสอบ Carbohydrate fermentation ใช้เพื่อระบุชนิดของ Lactobacilli ในระดับ species (Kandler and Weiss, 1986) จากการศึกษาครั้งนี้พบลักษณะของเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกและไม่สร้างสปอร์ที่มีขนาดของเซลล์แตกต่างกัน (ตัวอย่างตามรูปที่ 3.3) และทุกไอโซเลทไม่สามารถสร้างเอนไซม์ Catalase และ Oxidase พบแบบแผน Carbohydrate fermentation ที่แตกต่างกัน (ตัวอย่างตามรูปที่ 3.4) ซึ่งเมื่อระบุชนิดของแบคทีเรียที่พบตาม Kandler and Weiss (1986), Holt *et al.* (1994) และ New Zealand Dairy Research Institute (1995) ได้ Lactobacilli 3 กลุ่ม หลักจาก 10 ชนิดเด่น (ตารางที่ 3.4) คือ (1) กลุ่ม Homofermentative lactobacilli ที่พบคือ *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. farciminis* และ *L. gassari* (2) กลุ่ม Facultative heterofermentative lactobacilli ที่พบคือ *L. casei* และ *L. plantarum* และ (3) กลุ่ม Heterofermentative lactobacilli ที่พบคือ *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum* และ *L. fructosus*

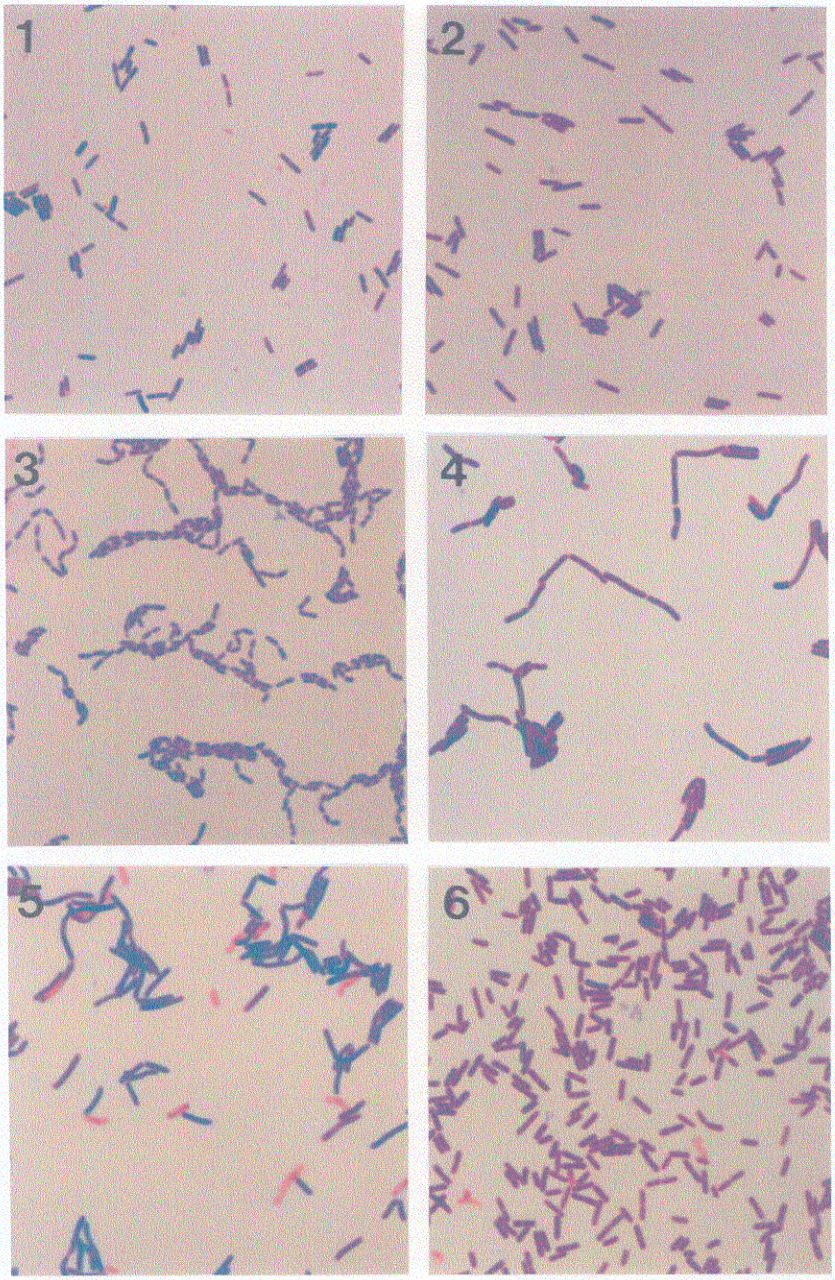
Homofermentative lactobacilli ผลิต Lactic acid โดยผ่าน Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway ซึ่งตามทฤษฎี เมื่อแบคทีเรียใช้ 1 โมเลกุลของ Glucose หรือ Fructose จะให้ 2 โมเลกุลของ Lactate แต่ถ้าเป็น Heterofermentative lactobacilli คือพวกที่ผลิต Lactic acid, Acetic acid และ Carbon dioxide เป็นหลักและอาจได้ Ethanol ด้วย ซึ่ง Pathway ที่เกี่ยวข้องทั้งหมดจะรวม Phosphoketolase pathway อยู่ด้วย สำหรับ Facultative heterofermentative lactobacilli ผลิต Lactic acid หรือ ผลผลิตผสมที่ประกอบด้วย Lactic acid, Acetic acid, Ethanol และ Formic acid ซึ่งขึ้นกับ

Substrate ซึ่งถ้าเป็น Hexose sugar จะใช้ใน Homofermentative metabolism แต่ถ้าเป็น Pentose sugar จะใช้ใน Heterofermentative metabolism ซึ่งโดยปกติมีการกล่าวถึงกลุ่ม Facultative heterofermentative lactobacilli ในฐานะที่เป็น Homofermentative lactobacilli (Brookes and Buckle, 1992)

นอกจากนี้ยังได้เลือกเชื้อยืนยันว่าเป็นชนิดที่ระบุได้ โดยเลือกไอโซเลทของ *Lactobacillus plantarum* และ *L. fermentum* ซึ่งเป็น Lactobacilli ชนิดเด่นที่พบ ไปวิเคราะห์ชนิดโดยใช้วิธีทาง Polymerase chain reaction (PCR) ด้วยการตรวจหา 16S-23S rRNA gene intergenic region ซึ่งได้ดำเนินการตาม Tannock *et al.* (1999, เอกสารแนบในภาคผนวก ง) และได้ผลสอดคล้องกันคือทุกไอโซเลทของ *L. plantarum* และ *L. fermentum* ที่ระบุชนิดได้ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีนั้นเป็น Lactobacilli ทั้งสอง species

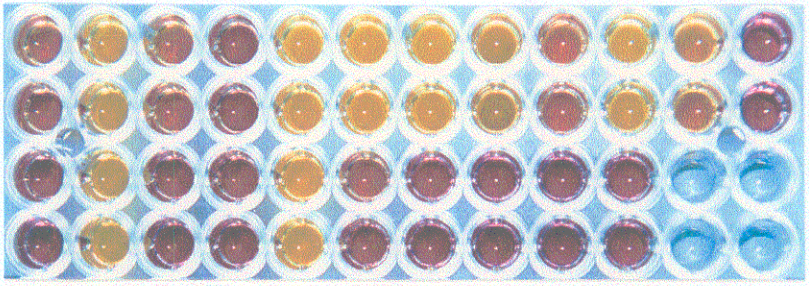


รูปที่ 3.2 โคโลนีของ Silage lactobacilli อายุ 48 ชั่วโมงที่เจริญบน Rogosa agar

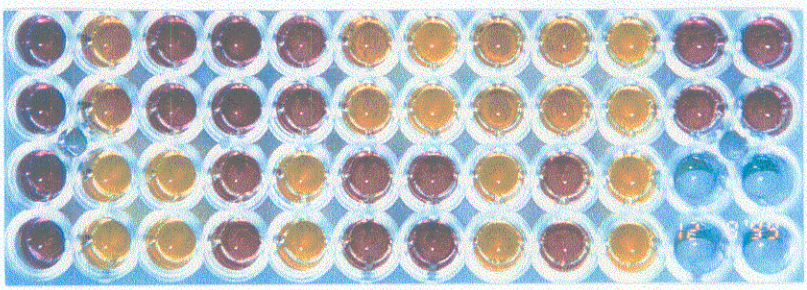


รูปที่ 3.3 สายพันธุ์เด่นของ Lactobacilli ที่แยกได้จากตัวอย่าง Silage ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสงของเซลล์ Lactobacilli ที่ผ่านการย้อมสีแบบแกรม (X1000): *Lactobacillus brevis* (1), *L. buchneri* (2), *L. casei* (3 และ 4 เป็นตัวอย่างของ *L. casei* สองสายพันธุ์ตามลำดับ), *L. fermentum* (5) และ *L. plantarum* (6)

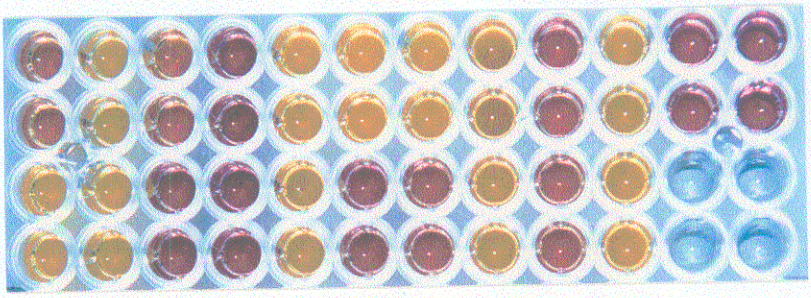
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		



(ก)



(ข)

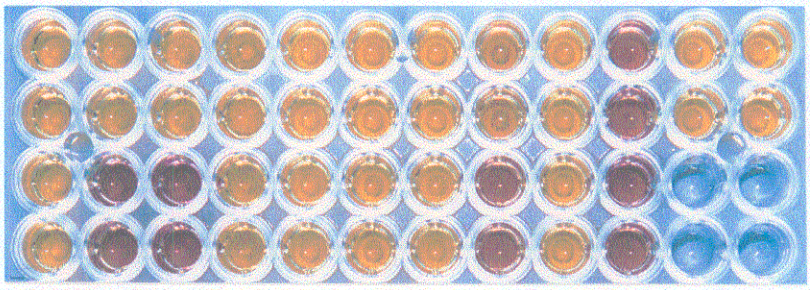


(ค)

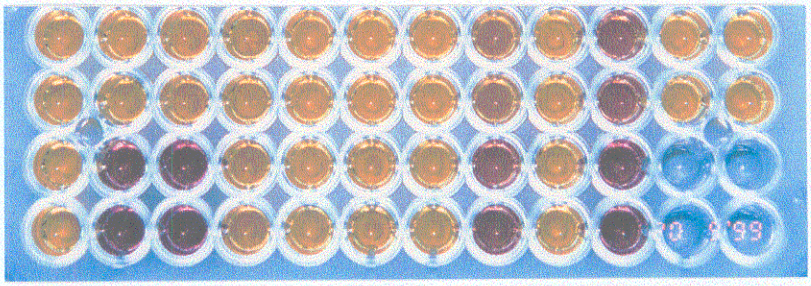
รูปที่ 3.4 ตัวอย่างแบบแผน Carbohydrate fermentation ของ Lactobacilli ที่แยกได้จากตัวอย่าง Silage: *Lactobacillus brevis* 2 สายพันธุ์ (**ก** และ **ข**), *L. buchneri* (**ค**), *L. casei* (**ง**), *L. casei* subsp. *casei* (**จ**), และ *L. plantarum* (**ฉ**)

ตำแหน่งที่: 1, Amygdalin; 2, L-Arabinose; 3, Cellobiose; 4, Esculin; 5, Fructose; 6, Galactose; 7, Glucose; 8, Gluconate; 9, Lactose; 10, Maltose; 11, Mannitol; 12, Mannose; 13, Melezitose; 14, Melibiose; 15, Raffinose; 16, Rhamnose; 17, Ribose; 18, Salicin; 19, Sorbitol; 20, Sucrose; 21, Trehalose; และ 22, Xylose

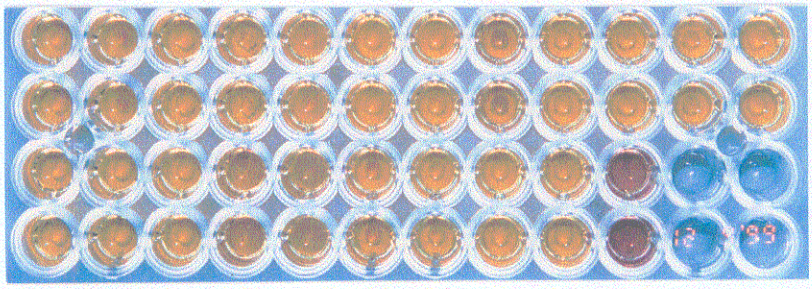
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		



(ง)



(จ)



(ฉ)

รูปที่ 3.4 *(ต่อ)* ตัวอย่างแบบแผน Carbohydrate fermentation ของ Lactobacilli ที่แยกได้จากตัวอย่าง Silage: *Lactobacillus brevis* 2 สายพันธุ์ (ก และ ข), *L. buchneri* (ค), *L. casei* (ง), *L. casei* subsp. *casei* (จ), และ *L. plantarum* (ฉ)

ตำแหน่งที่: 1, Amygdalin; 2, L-Arabinose; 3, Cellobiose; 4, Esculin; 5, Fructose; 6, Galactose; 7, Glucose; 8, Gluconate; 9, Lactose; 10, Maltose; 11, Mannitol; 12, Mannose; 13, Melezitose; 14, Melibiose; 15, Raffinose; 16, Rhamnose; 17, Ribose; 18, Salicin; 19, Sorbitol; 20, Sucrose; 21, Trehalose; และ 22, Xylose

ตารางที่ 3.4 Lactobacilli ชนิดเด่น ที่ตรวจพบใน Silage ที่ผลิตในประเทศไทย จากกลุ่มเชื้อที่ได้แยกคัดเลือกมาวิเคราะห์ชนิด

กลุ่มและชนิดของ Lactobacilli	Silage ที่พบแบคทีเรีย	แหล่งผลิต Silage
Homofermentative lactobacilli		
1) *Lactobacillus acidophilus*	Sorghum silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
	Grass silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
	Grass silage	อสค. อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
	Corn silage	บริษัทแดรี่ ซัพพลาย แอนด์เซอร์วิส จำกัด
	Grass silage	ฟาร์มโชคชัย
2) *Lactobacillus delbrueckii*	Sorghum silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
	Grass silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
	Grass silage	อสค. อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
	Corn silage	บริษัทแดรี่ ซัพพลาย แอนด์เซอร์วิส จำกัด
	Grass silage	ฟาร์มโชคชัย
	Grass silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยขอนแก่น
3) *Lactobacillus farciminis*	Sorghum silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
	Grass silage	อสค. อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
	Corn silage	บริษัทแดรี่ ซัพพลาย แอนด์เซอร์วิส จำกัด
4) *Lactobacillus gasseri*	Sorghum silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
	Grass silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
	Grass silage	อสค. อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
	Corn silage	บริษัทแดรี่ ซัพพลาย แอนด์เซอร์วิส จำกัด
Facultative heterofermentative lactobacilli		
1) *Lactobacillus casei*	Sorghum silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.4 *(ต่อ)*

กลุ่มและชนิดของ Lactobacilli	Silage ที่พบแบคทีเรีย	แหล่งผลิต Silage
1) *Lactobacillus casei* (ต่อ)	Grass silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
	Grass silage	อสค. อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
	Corn silage	บริษัทแดรี่ ซัพพลาย แอนด์เซอร์วิส จำกัด
	Grass silage	ฟาร์มโชคชัย
2) *Lactobacillus plantarum*	Sorghum silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
	Grass silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
	Grass silage	อสค. อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
	Corn silage	บริษัทแดรี่ ซัพพลาย แอนด์เซอร์วิส จำกัด
	Grass silage	ฟาร์มโชคชัย
	Grass silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยขอนแก่น
Heterofermentative lactobacilli		
1) *Lactobacillus brevis*	Sorghum silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
	Grass silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
	Corn silage	บริษัทแดรี่ ซัพพลาย แอนด์เซอร์วิส จำกัด
2) *Lactobacillus buchneri*	Sorghum silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
	Grass silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
3) *Lactobacillus fermentum*	Sorghum silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
	Grass silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
	Grass silage	อสค. อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี และ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา
	Corn silage	บริษัทแดรี่ ซัพพลาย แอนด์เซอร์วิส จำกัด
	Grass silage	ฟาร์มโชคชัย
4) *Lactobacillus fructosus*	Sorghum silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
	Grass silage	ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. ผลการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ของ Lactobacilli โดยใช้วิธีทางกรดนิวคลีอิค

จากการพัฒนาวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งเป็นวิธีทางกรดนิวคลีอิควิธีหนึ่ง เพื่อแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ของ Lactobacilli แทนวิธี Ribotyping โดยเริ่มจาก 3 วิธีการที่อาศัยการเพิ่มปริมาณ Genomic DNA ของ Lactobacilli ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) คือ (ก) วิธีการตาม Cocconcelli *et al.* (1995) ซึ่งใช้ Random primer (5'-AGCAGCGTGG-3') (ข) วิธีการตาม Quere *et al.* (1997) ซึ่งใช้ OPA3 primer (5'-AGTCAGCCAC-3') และ (ค) วิธีการที่กำหนดขึ้นโดยยึดตาม RAPD Anlysis Primers ที่เลือกจากข้อมูลของผู้ผลิต (RAPD Analysis Primer Set, Pharmacia Biotech, Sweden) คือ Primer 2 (5'-GTTTCGCTCC-3') และ Primer 3 (5'-GTAGACCCGT-3') นั้นพบว่าวิธีการสุดท้ายให้ผลดีที่สุดสำหรับแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมาย ซึ่งวิธีการนี้ใช้ PCR reaction mixture ที่ประกอบด้วย 1X PCR buffer ที่มี 1.5 mM $MgCl_2$ (QIAGEN) 100 ไมโครโมล ของแต่ละชนิดของ Nucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Boehringer Mannheim) 20 พิโคโมล ของ Primer 2 หรือ Primer 3 2 หน่วย ของ *Taq* DNA polymerase (QIAGEN) และ 100 นาโนกรัม ของ Genomic DNA และเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ GeneAmp™ PCR System 9800 (Perkin-Elmer) โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาตามลำดับ ดังนี้ (1) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ. เป็นเวลา 2 นาที (2) Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 29°ซ. เป็นเวลา 1.5 นาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 1.5 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) Extension ที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 10 นาที เป็นรอบสุดท้าย และเพื่อให้ได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพและคุ้มค่าที่สุดสำหรับกระบวนการ PCR ที่ใช้วิเคราะห์แบบแผนของ Lactobacilli เป้าหมาย จึงได้ศึกษาสภาวะ (Condition) ที่เหมาะสม ดังนี้

1) ส่วนประกอบที่เหมาะสมของ PCR reaction mixture

1.1) ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ใน PCR buffer โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นต่างๆ ที่ใช้ดังนี้ 0, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 mM

1.2) ปริมาณ *Taq* DNA polymerase โดยเปรียบเทียบปริมาณที่ใช้คือ 1, 1.6, 2.0 และ 2.5 หน่วย ใน 50 ไมโครลิตรของ PCR reaction mixture

1.3) ความเข้มข้นของ RAPD Analysis Primer โดยเปรียบเทียบที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 40 พิโคโมล

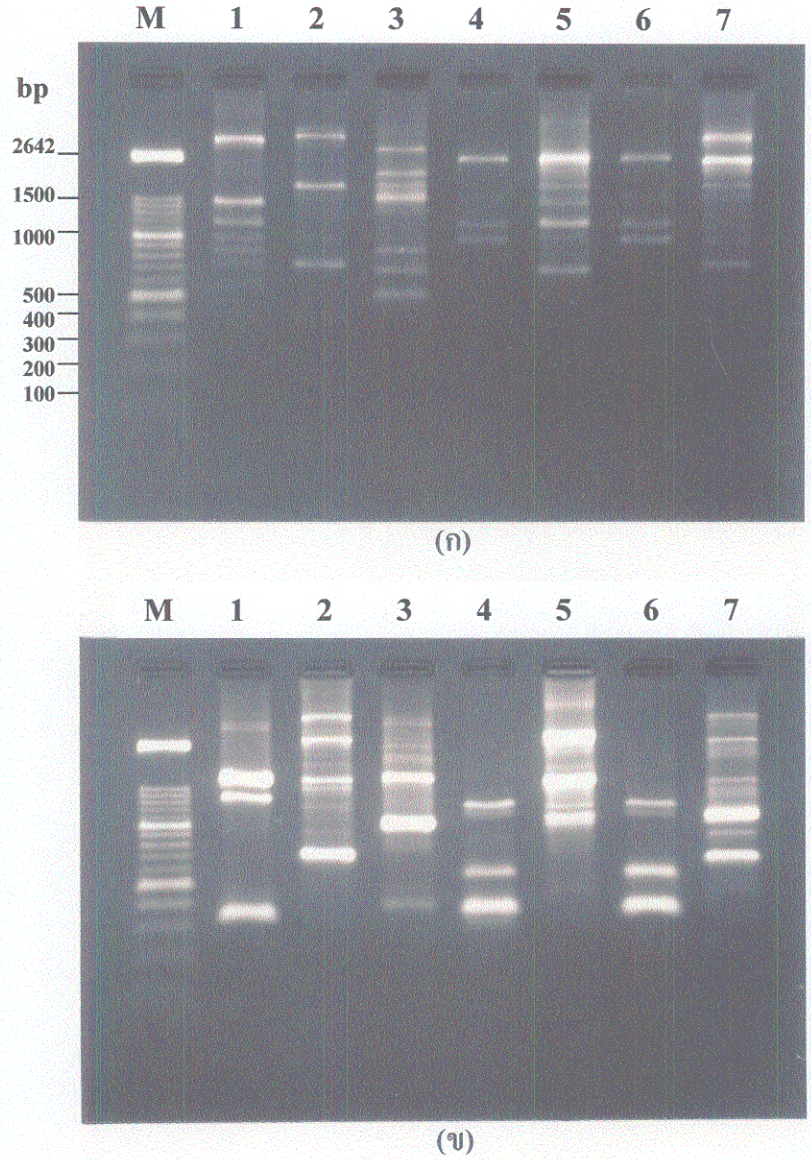
2) เวลาที่เหมาะสมสำหรับ Denaturation, Annealing และ Extension ในช่วงการเพิ่มปริมาณ DNA จำนวน 40 รอบ โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้เวลา 30 วินาที และ 1 นาที สำหรับ Denaturation และ 1 และ 1.5 นาที สำหรับ Annealing และเปรียบเทียบ 1 และ 1.5 นาที เช่นเดียวกันสำหรับ Extension

ผลการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการ PCR ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์แบบแผนของ Lactobacilli ที่แยกได้จาก Silage คือ PCR reaction mixture ที่ประกอบด้วย 1X PCR buffer ที่มี 1.5 mM $MgCl_2$ (QIAGEN) 100 ไมโครโมล ของแต่ละชนิดของ Nucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Boehringer Mannheim) 20 พิโคโมล ของ Primer 2 หรือ Primer 3 1.6 หน่วย ของ *Taq* DNA polymerase (QIAGEN) และ 100 นาโนกรัม ของ Genomic DNA และเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ GeneAmp™ PCR System 9800 (Perkin-Elmer) โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาดังนี้ เริ่มที่ 94°ซ. เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเพิ่มจำนวน DNA จำนวน 40 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วย Denaturation ที่ 94°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่ 29°ซ. เป็นเวลา 1.5 นาที และ Extension ที่ 72°ซ. เป็นเวลา 1.5 นาที และสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 10 นาที

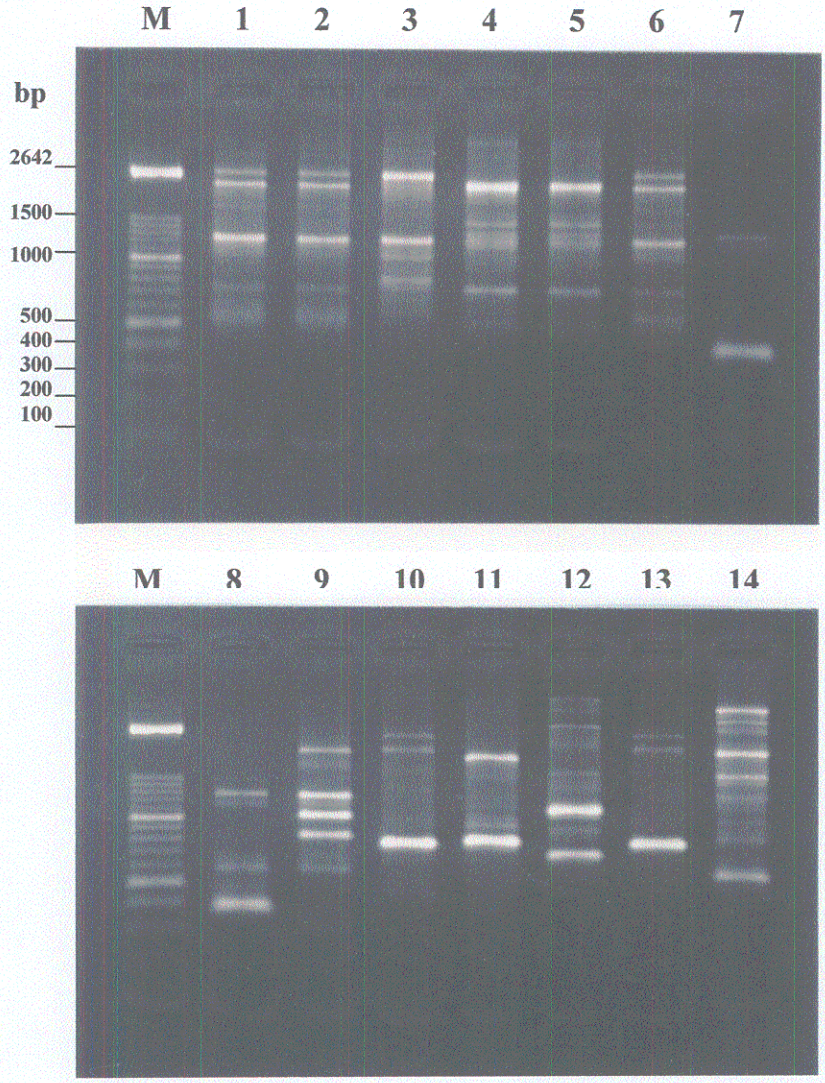
เมื่อคำนึงถึง RAPD Analysis Primer 2 และ Primer 3 ที่เลือกใช้จากที่ผู้ผลิตซึ่งผลิตให้เลือกจำนวน 6 Primers Primers ทั้งสองข้างต้นเป็น Primer ที่ควรเลือกใช้มากที่สุดเนื่องจากผู้ผลิตได้แสดงผลสำเร็จของการใช้ในการวิเคราะห์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ต่างๆ และจากผลการศึกษาในครั้งนี้ก็ประสบความสำเร็จในการใช้เพื่อแยกสายพันธุ์ของ Lactobacilli และเมื่อเปรียบเทียบผลสำเร็จในการใช้วิเคราะห์สายพันธุ์ของ Lactobacilli โดยรวมแล้ว Primer 3 สามารถใช้เพื่อปริมาณของ DNA เป้าหมาย (Target DNA) ได้ปริมาณมากกว่า Primer 2 เมื่อใช้ Template DNA เริ่มต้นในความเข้มข้มเท่ากัน (รูปที่ 3.5) จึงเลือก Primer 3 ในการวิเคราะห์ความหลากหลายของสายพันธุ์ของ Lactobacilli เป็นหลัก

Lactobacilli ที่แยกได้จาก Silage จากแหล่งผลิตต่างๆ ในการศึกษานี้มีความหลากหลายของชนิด (ตารางที่ 3.4) และความแตกต่างของสายพันธุ์ (รูปที่ 3.6 และ 3.7) ซึ่งจากแบบแผน RAPD ที่ได้ของ Lactobacilli ไอโซเลทที่เลือกมาวิเคราะห์ พบ *Lactobacillus plantarum* อย่างน้อย 8 สายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับความแตกต่างกันเล็กน้อยในแบบแผน Carbohydrate fermentation พบ Lactobacilli ชนิดที่มีความหลากหลายของสายพันธุ์ อย่างน้อย 3 สายพันธุ์คือ *L. casei* และ *L. fermentum* และชนิดที่มีความหลากหลายของสายพันธุ์ อย่างน้อย 2 สายพันธุ์ คือ *L. delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. brevis* และ *L. buchneri* ทั้งนี้ขึ้นกับจำนวนไอโซเลทที่นำมาตรวจวิเคราะห์

ปัญหาหนึ่งที่ประสบคือความไม่สม่ำเสมอของปริมาณผลผลิต DNA ที่มีผลกับความคมชัดของแบบแผน RAPD อาจเนื่องการประมาณความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้ด้วยการเปรียบเทียบกับ DNA ที่ทราบความเข้มข้นแล้วด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis ซึ่งเกิดการคลาดเคลื่อนเพียงเล็กน้อยได้ง่ายขณะปฏิบัติ ประกอบกับกระบวนการ PCR ในครั้งนี้ต้องการใช้ Template DNA ที่ความเข้มข้นต่ำมาก (100 นาโนกรัมต่อ 50 ไมโครลิตร ของ PCR reaction mixture)

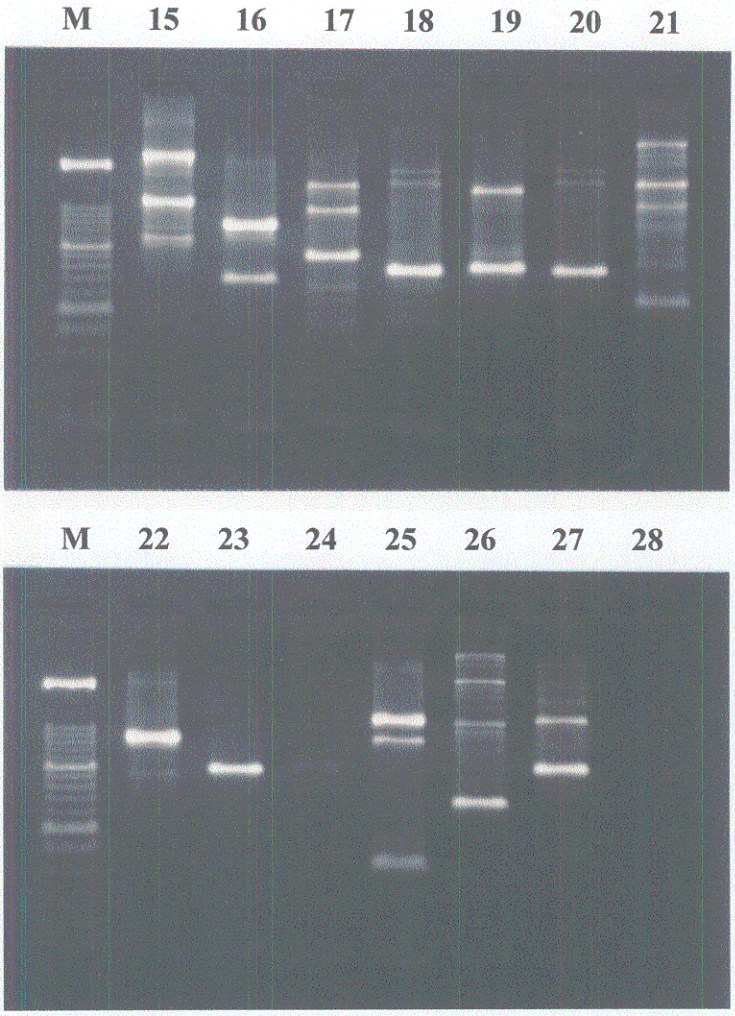


รูปที่ 3.5 ผลการวิเคราะห์ผลผลิต PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ DNA ของLactobacilli โดยใช้ RAPD Analysis Primer 2 ชนิด: Primer 2 (ก) และ Primer 3 (ข) ด้วย Agarose gel electrophoresis ช่องที่ (ทั้ง ก และ ข): M, DNA Molecular weight markers (100 bp DNA Ladder, Boehringer Mannheim); 1, *Lactobacillus reuteri* DSM 20016; 2, *L. plantarum* ATCC 14917; 3, *L. fermentum* ATCC 14931; 4 ถึง 7, Lactobacilli ที่แยกได้จาก Silage (4, *L. gasseri*; 5, *L. fermentum*; 6, *L. gasseri* อีกหนึ่งสายพันธุ์; 7, *L. plantarum*)



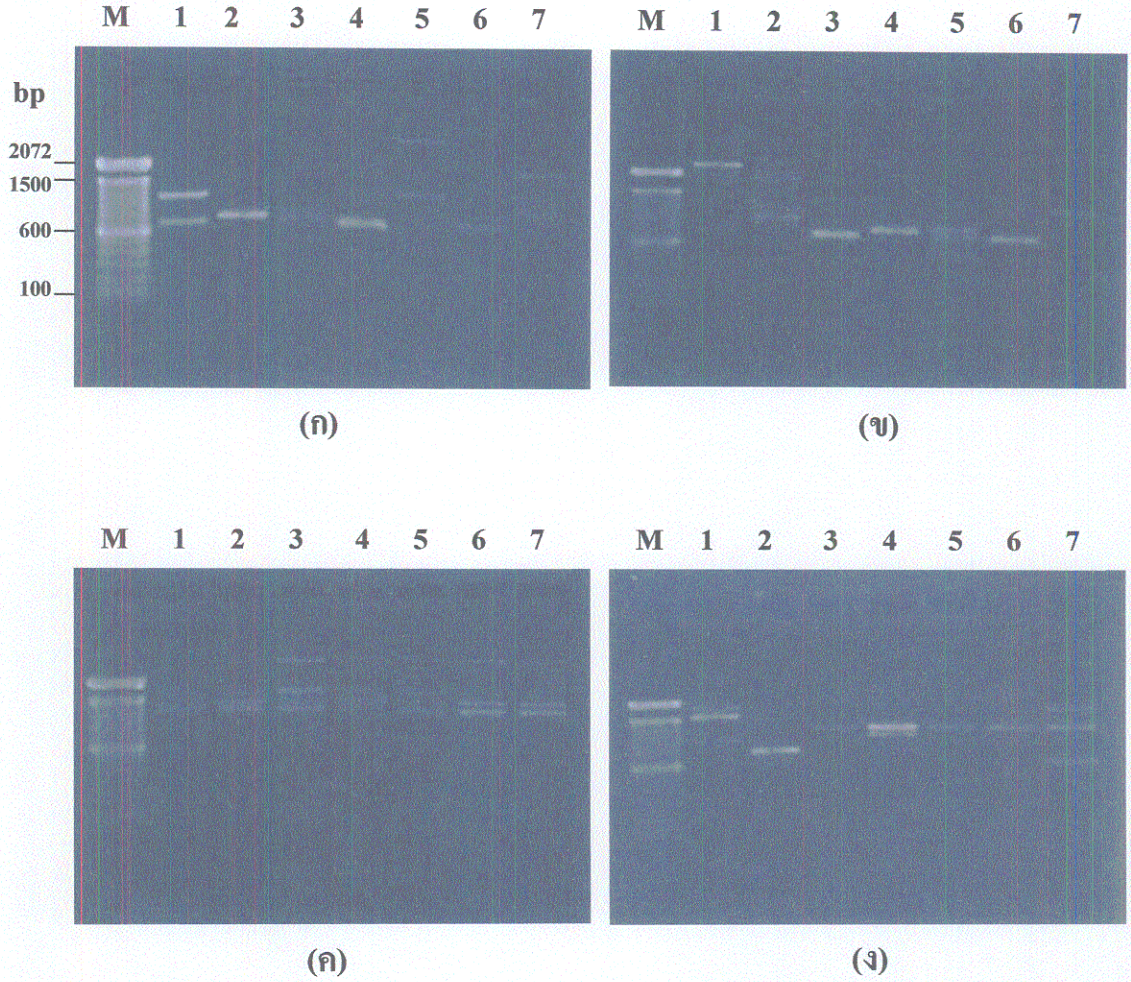
รูปที่ 3.6 แบบแผน RAPD ของ Lactobacilli เมื่อใช้ Primer 3

ช่องที่: M, DNA Molecular weight markers (100 bp DNA Ladder, Boehringer Mannheim); 1 ถึง 24, Lactobacilli ที่แยกจาก Silage (ช่องที่ 1, 2, 3, 6, และ 15; *Lactobacillus fermentum* ต่างไอโซเลทและ/หรือต่างสายพันธุ์; 4 และ 5, *L. delbrueckii* ต่างไอโซเลท; 7, 8, และ 22, *L. gasseri* ต่างไอโซเลทและต่างสายพันธุ์; 9, *L. farciminis*; 10 ถึง 13, 16 ถึง 20, 23 และ 24, *L. plantarum* ต่างไอโซเลทและต่างสายพันธุ์; 14 และ 21, *L. acidophilus* ต่างไอโซเลท); 25, *L. reuteri* DSM 20016; 26, *L. plantarum* ATCC 14917; 27, *L. fermentum* ATCC 14931; 28, Negative control



รูปที่ 3.6 แบบแผน RAPD ของ Lactobacilli เมื่อใช้ Primer 3

(ต่อ) ช่องที่: M, DNA Molecular weight markers (100 bp DNA Ladder, Boehringer Mannheim); 1 ถึง 24, Lactobacilli ที่แยกจาก Silage (ช่องที่ 1, 2, 3, 6, และ 15; *Lactobacillus fermentum* ต่างไอโซเลทและ/หรือต่างสายพันธุ์; 4 และ 5, *L. delbrueckii* ต่างไอโซเลท; 7, 8 และ 22, *L. gasseri* ต่างไอโซเลทและต่างสายพันธุ์; 9, *L. farciminis*; 10 ถึง 13, 16 ถึง 20, 23 และ 24, *L. plantarum* ต่างไอโซเลทและต่างสายพันธุ์; 14 และ 21, *L. acidophilus* ต่างไอโซเลท); 25, *L. reuteri* DSM 20016; 26, *L. plantarum* ATCC 14917; 27, *L. fermentum* ATCC 14931; 28, Negative control



รูปที่ 3.7 แบบแผน RAPD ของ Lactobacilli ชนิดเด่นที่พบใน Silage จากแหล่งผลิตในประเทศไทย แบบแผน RAPD ที่ต่างกันของ Lactobacilli ชนิดหนึ่งๆ แสดงถึงสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน ทุกช่องที่แสดงเป็นแบบแผน RAPD ของ Lactobacilli ต่างไอโซเลทกัน

ช่องที่ M, DNA Molecular weight markers (100 bp DNA Ladder, GIBCOBRL)

(ก) และ (ข) ช่องที่ 1 ถึง 7, *Lactobacillus plantarum*

(ค) ช่องที่ 1 ถึง 7, *L. casei*

(ง) ช่องที่ 1, 3 และ 4, *L. brevis*; 2, *L. plantarum*; 5 และ 6, *L. buchneri*; 7, *L. fructosus*

บทที่ 4
บทสรุป

1. สรุปผลการวิจัย

ตัวอย่าง Silage ที่สามารถรวบรวมได้เพื่อนำมาตรวจวิเคราะห์หาแบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacilli มีจำนวนทั้งสิ้น 27 ตัวอย่าง เป็น Silage ที่ได้จากกระบวนการหมักโดยธรรมชาติ (อาศัยจุลินทรีย์ที่มีอยู่หรือปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ) จากแหล่งผลิต 6 แหล่ง ในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย และตัวอย่าง Silage ที่ได้นี้แตกต่างกันตามพืชวัตถุดิบที่ใช้ผลิต ซึ่งมี 3 ชนิดหรือประเภทหลัก คือ (1) Sorghum silage ใช้ข้าวฟ่างชนิดที่เป็นพืชอาหารสัตว์ (Forage *sorghum*) เป็นวัตถุดิบในการผลิต โดยผลิตจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา) ที่มีการทดลองใช้ข้าวฟ่างแตกต่างกัน 4 สายพันธุ์ (Jumbo, Nectar, Superdan และ Sugargraze; Suksombat, 1997) ในการผลิต ซึ่งวัตถุดิบผ่านการหมักในถุงพลาสติกหนาสองชั้นที่บรรจุวัสดุหมักปริมาณ 16 กิโลกรัมต่อถุง นาน 1 เดือน (2) Grass silage ใช้หญ้าเป็นวัตถุดิบในการผลิตและได้จากแหล่งผลิต 5 แหล่ง คือ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เป็นตัวอย่าง Silage ที่ทดลองผลิตจากหญ้า 2 สายพันธุ์ (Nutrifeed และ Ruzi grass; Suksombat, 1997) และผ่านการหมักในถุงพลาสติกหนาสองชั้นที่บรรจุวัสดุหมัก 16 กิโลกรัมต่อถุง เป็นเวลา 1 เดือน องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อสค.) (อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา) เป็นตัวอย่าง Silage ที่ผ่านการหมักในบ่อดิน ขนาดบรรจุ 1000 ตัน จำนวน 2 บ่อ (บ่อที่หมักได้ 1 เดือน และหมักข้ามปี) อสค. (อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี) ตัวอย่างผ่านการหมักในบ่อซีเมนต์ ขนาดบรรจุ 300 ตัน ซึ่งได้ใช้ประโยชน์ผลิตภัณฑ์ไปแล้วจนถึงส่วนล่างของบ่อ ฟาร์มโชคชัย มีทั้งที่ได้จากการหมักในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ ขนาดบรรจุประมาณ 700 ตันต่อบ่อ ซึ่งได้ใช้ประโยชน์ Silage จนถึงส่วนล่างของบ่อ และฟาร์มมหาวิทยาลัยขอนแก่น (อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น) เป็นงานทดลองผลิตหญ้าหมัก Ruzi ซึ่งหมักได้ 45 วัน และ (3) Corn silage จากการผลิตที่ใช้ทั้งเปลือกหรือส่วนที่ห่อหุ้มฝักและซังของข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ ผลิตจากบริษัทแดรี่ ซัพพลาย แอนด์เซอร์วิส จำกัด วัตถุดิบผ่านการหมักในถุงพลาสติกหนาสองชั้นที่บรรจุวัสดุหมักประมาณ 2 ตันต่อถุง เป็นเวลา 21 วัน

จากการวิเคราะห์หาปริมาณ *Lactobacilli* พร้อมทั้งวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในตัวอย่าง Silage ทั้ง 27 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณ Lactobacilli ใน Sorghum silage และ Grass silage โดยเฉลี่ยใกล้เคียงกันคืออยู่ในช่วง 10^5 ถึง 10^7 CFU/กรัมของ Silage (น้ำหนักเปียก) มีบางตัวอย่างที่พบปริมาณ Lactobacilli สูงสุดซึ่งประมาณ 10^8 CFU ต่อกรัมของ Silage คือตัวอย่าง Sorghum silage (ใช้

Forage sorghum พันธุ์ Jumbo และ Superdan เป็นวัตถุดิบ) ที่ได้จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ($1.03x10^8$ และ $1.45 x10^8$ CFU/กรัม ตามลำดับ) และGrass silage (ใช้ Forage pennisetum เป็นวัตถุดิบ) ที่ได้จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ($1.06x10^8$ CFU/กรัม) สำหรับ Corn silage ที่ได้จากบริษัทแดรี่ ซัพพลาย แอนด์เซอร์วิส จำกัด พบปริมาณ Lactobacilli โดยเฉลี่ย $1.07x10^8$ CFU/กรัม ส่วนความเป็นกรด-ด่างในทุกชนิดของ Silage มีค่าแตกต่างกันในช่วงกว้างคือ 4.0 ถึง 8.0

เมื่อเลือกเก็บ Lactobacilli ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่แตกต่างกัน ซึ่งได้จำนวน 370 ไอโซเลท และวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยทั้งสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ และวิเคราะห์หาความหลากหลายของสายพันธุ์ของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวด้วยวิธีทางกรดนิวคลีอิค ซึ่ง Lactobacilli เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อน (Rod) ที่มีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งจากการระบุชนิดของ Lactobacilli ที่แยกจาก Silage ด้วยวิธีที่ระบุตาม Kandler and Weiss (1986), Holt *et al.* (1994) และ New Zealand Dairy Research Institute (1995) พบ Lactobacilli 3 กลุ่มหลักจาก 10 ชนิดเด่น คือ (1) กลุ่ม Homofermentative lactobacilli ที่พบคือ *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. farciminis* และ *L. gassari* (2) กลุ่ม Facultative heterofermentative lactobacilli ที่พบคือ *L. casei* และ *L. plantarum* และ (3) กลุ่ม Heterofermentative lactobacilli ที่พบคือ *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum* และ *L. fructosus*

จากการพัฒนาวิธี Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งเป็นวิธีทางกรดนิวคลีอิควิธีหนึ่ง เพื่อแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ของ Lactobacilli แทนวิธี Ribotyping พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการ Polymerase chain reaction (PCR) ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์แบบแผน RAPD ของ Lactobacilli ที่แยกได้จาก Silage คือ PCR reaction mixture ที่ประกอบด้วย 1X PCR buffer ที่มี 1.5 mM $MgCl_2$ (QIAGEN) 100 ไมโครโมล ของแต่ละชนิดของ Nucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Boehringer Mannheim) 20 พิโคโมล ของ Primer 3 (RAPD Analysis Primer Set, Pharmacia Biotech) 1.6 หน่วย ของ *Taq* DNA polymerase (QIAGEN) และ 100 นาโนกรัม ของ Genomic DNA และเพิ่มปริมาณ DNA ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิ GeneAmp™ PCR System 9800 (Perkin-Elmer) โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาดังนี้ เริ่มที่ 94°ซ. เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเพิ่มจำนวน DNA จำนวน 40 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วย Denaturation ที่ 94°ซ. เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่ 29°ซ. เป็นเวลา 1.5 นาที และ Extension ที่ 72°ซ. เป็นเวลา 1.5 นาที และสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72°ซ. เป็นเวลา 10 นาที

Lactobacilli ที่แยกได้จาก Silage จากแหล่งผลิตต่างๆ ในการศึกษานี้มีความหลากหลายของชนิดและความแตกต่างของสายพันธุ์ ซึ่งจากแบบแผน RAPD ที่ได้ของ Lactobacilli ไอโซเลทที่เลือกมาวิเคราะห์ พบ *Lactobacillus plantarum* อย่างน้อย 8 สายพันธุ์ Lactobacilli ชนิดที่มีความ

หลากหลายของสายพันธุ์อย่างน้อย 3 สายพันธุ์คือ *L. casei* และ *L. fermentum* และชนิดที่มีความหลากหลายของสายพันธุ์อย่างน้อย 2 สายพันธุ์คือ *L. delbrueckii*, *L. gasseri*, *L. brevis* และ *L. buchneri* ทั้งนี้ขึ้นกับจำนวนไอโซเลทที่นำมาตรวจวิเคราะห์

2. ข้อเสนอแนะ

Lactobacillus plantarum เป็นแบคทีเรียที่มีรายงานการใช้เป็นหัวเชื้อ (Inoculant) เพื่อเร่งการสร้างกรดในกระบวนการผลิต Silage อย่างกว้างขวาง และ Lactobacilli หลาย species ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* และ *L. delbrueckii* เป็นแบคทีเรียที่เรียกว่า "Probiotic lactic acid bacteria" (Hill and Hill, 1986; Cocconcelli *et al.*, 1991; Flores, 1991; Rooke, 1991; Fuller, 1992; Cai *et al.*, 1997) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ได้ข้อมูลด้านความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์ของ Lactobacilli ชนิดเด่นที่พบใน Silage ที่ได้จากการหมักตามธรรมชาติในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *L. plantarum*, *L. fermentum* และ *L. casei* จึงน่าจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่สามารถใช้ในเพื่อศึกษาต่อไปถึงความเหมาะสมในการเลือกจุลินทรีย์ท้องถิ่นที่สามารถใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิต Silage และศึกษาความสามารถในการอยู่รอดและ colonization ของ Silage lactobacilli ในทางเดินอาหารของโค ซึ่งมีความสำคัญและช่วยในการพัฒนาการผลิตผลผลิตทั้ง Silage และ Probiotics สำหรับสัตว์ในประเทศไทยอย่างมีประสิทธิภาพ

บรรณานุกรม

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2545. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2543/44. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Allen, D. 1990. *Planned Beef Production and Marketing*. Oxford: BSP Professional Books.

Auerbach, H., E. Oldenburg, and F. Weissbach. 1998. Incidence of *Penicillium roqueforti* and roquefortine C in silage. *Journal of Scientific and Food Agriculture*. **76**: 565-572.

Bates, E.M., H.J. Gilbert, G.P. Hazlewood, . Huckle, J.I. Laurie, and S.P. Mann. 1989. Expression of *Clostridium thermocellum* endoglucanase gene in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. **55**: 2095-2097.

Brookes, R.M., and A.E. Buckle. 1992. Lactic Acid in Plant Silage. *In* B.J.B. Wood (ed.). 1992. The Lactic Acid Bacteria: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Volume 1 (pp. 363-386). London: Elsevier Applied Science.

Cai, Y., S. Ohmomo, M. Ogawa, and S. Kumai. 1997. Effect of NaCl-tolerant lactic acid bacteria and NaCl on the fermentation characteristics and aerobic stability of silage. *Journal of Applied Microbiology*. **83**: 307-313.

Cai, Y., S. Kumai, M. Ogawa, Y. Benno, and T. Nakase. 1999. Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(7): 2901-2906.

Cintas, L.M., M.P. Casaus, C. Herranz, I.F. Nes, and P.E. Hernández. 2001. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International*. **7**(4): 281-305.

Cocconcelli, P.S., E. Triban, M. Basso, and V. Bottazzi. 1991. Use of DNA probes in the study of silage colonization by *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains. *Journal of Applied Bacteriology*. **71**: 296-301.

Cocconcelli, P.S., D. Porro, S. Galandini, and L. Senini. 1995. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Letters in Applied Microbiology*. **21**: 376-379.

Cole, R.J., and R.H. Cox. 1981. *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. New York: Academic Press, Inc.

Diep, D.B., L.S. Håvarstein, and I.F. Nes. 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *Journal of Bacteriology*. **178**: 4472-4483.

Ehrmann, M.A., A. Remiger, V.G. Eijsink, and R. Vogel. 2000. A gene cluster encoding plantaricin 1.25β and other bacteriocin-like peptides in *Lactobacillus plantarum* TMW1.25. *Biochemia et Biophysica Acta*. **1490**: 355-361.

Flores, D.A. 1991. Biotechnology and the improvement of silage (tropical and temperate) rumen digestion : a mini-review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **35**: 277-281.

Fitzsimons, A., F. Duffner, D. Curtin, G. Brophy, P. O'Kiely, and M. O'Connell. 1992. Assessment of *Pediococcus acidilactici* as a potential silage inoculant. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**: 3047-3052.

Frisvad, J.C., and U. Thrane. 1996. Mycotoxin production by food-borne fungi. *In* R.A. Samson, E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad, and O. Filtenborg (eds.). *Introduction to Food-borne Fungi* (pp. 251-260). Baarn, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

Fuller, R. 1992. *Probiotics: The Scientific Basis*. London: Chapman & Hall.

Fuller, R. 1995. Probiotics: their development and use. *In* R. Fuller, P.J. Heidt, V. Rusch, and D. Van der Waaij (eds.). *Probiotics: Prospects of Use in Opportunistic Infections* (pp. 1-8). Herborn Dill: Institute for Microbiology and Biochemistry, Old Herborn University.

Gillespie, J.R. 1992. *Modern Livestock and Poultry Production*. 4th Edtion. Neison: Delmar Publishers, Inc.

Hággblom, P. 1990. Isolation of roquefortine C from feed grain. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**: 2924-2926.

Hill, H.A., and J.E. Hill. 1986. The value of plasmid profiling in monitoring *Lactobacillus plantarum* in silage fermentation. *Current Microbiology*. **13**: 91-94.

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, S.T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition. Baltimore: Williams & Wilkins.

Hoover, D.G., and L.R. Steenson. 1993. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. California: Academic Press.

Huber, J.T. 1997. Probiotics in cattle. *In* R. Fuller. *Probiotics 2: Application and Practical Aspects* (pp. 162-186). London: Chapman & Hall.

Jiménez-Díaz, R., J.L. Ruiz-Barba, D.P. Cathcart, H. Holo, I.F. Nes, K.H. Sletten, and P.J. Warner. 1995. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO 10, the activity of which depends on the complementary action of two peptides. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**: 4459-4463.

Jones, S., and P.J. Warner. 1990. Cloning and expression of alpha amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* in a stable plasmid vector in *Lactobacillus plantarum*. *Letters in Applied Microbiology*. **11**: 214-219.

Kandler, O, and N. Weiss. 1986. Regular, nonsporing gram-positive rods. *In* P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2 (pp. 1208-1234). Baltimore: Williams & Wilkins.

Kato, T., T. Matsuda, E. Ogawa, H. Ogawa, H. Kato, U. Doi, and R. Nakamura. 1994. Plantaricin-149, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NRIC 149. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. **77**: 277-282.

Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. **70**: 337-349.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **12**: 39-86.

Kung, L., Jr., J.R. Robinson, N.K. Ranjit, J.H. Chen, C.M. Golt, and J.D. Pesek. 2000. Microbial populations, fermentation end-products, and aerobic stability of corn silage treated with ammonia or a propionic acid-based preservative. *Journal of Dairy Science*. **83**: 1479-1486.

Luchansky, J.B., M.C. Tennant, and T.R. Klaenhammer. 1991. Molecular cloning and deoxyribonucleic acid polymorphisms in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri*. *Journal of Dairy Science*. **74**: 3293-3302.

Nadeau, E.M.G., D.R. Buxton, J.R. Russell, M.J. Allison, and J.W. Young. 2000. Enzyme, bacterial inoculant, and formic acid effects on silage composition of orchardgrass and alfalfa. *Journal of Dairy Science*. 83: 1487-1502.

New Zealand Dairy Research Institute. 1995. Identification of Lactobacilli. Starters and Microbiology Section, New Zealand Dairy Research Institute. *Method BJC.1- Identification of Lactobacilli*. Issue 3, 12 October 1995: 1-18.

Nout, M.J.R., H.M. Bouwmeester, J. Haaksma, and H. van Dyke. 1993. Fungal growth in silages of sugarbeet press pulp and maize. *Journal of Agricultural Science*. **121**: 323-326.

Pelhate, J. 1977. Maize silage: incidence of moulds during conservation. *Folia Veterinaria Latina.* **7**: 1-16.

Piard, J.C., and M. Desmazeaud. 1991. Inhibition factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait.* **71**: 525-541.

Piard, J.C., and M. Desmazeaud. 1992. Inhibition factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait.* **72**: 113-142.

Quere, F., A. Deschamps, and M.C. Urdaci. 1997. DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum. Journal of Applied Microbiology.* **82**: 783-790.

Remiger, A., V.-G.-H. Eijsink, M.A. Ehrmann, K. Sletten, I.F. Nes, and R.F. Vogel. 1999. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin 1.25α and 1.25β, two bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* TMW1.25. *Journal of Applied Microbiology.* **86**: 1053-1058.

Rodtong, S., and G.W. Tannock. 1993. Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology.* **59**: 3480-3484.

Rooke, J.A. 1991. Lactic acid bacteria and silage fermentations. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* **51**: 560-562.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Scheirlinck, T., J. Mahillon, H. Joos, P. Dhase, and P. Michels. 1989. Integration and expression of alpha amylase and endoglucanase genes in the *Lactobacillus plantarum* chromosome. *Applied and Environmental Microbiology.* **55**: 2130-2137.

Sharp, R., A.G. O'Donnell, H.G. Gilbert, and G.P. Hazlewood. 1992. Growth and survival of genetically manipulated *Lactobacillus plantarum* in silage. *Applied and Environmental Microbiology.* **58**: 2517-2522.

Stiles, M.E., and J.W. Hastings. 1991. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trend in Food Science and Technology.* **2**: 247-251.

Suksombat, W. 1997. Production, growth and nutritive value of six forage species grown at Suranaree University of Technology. I. Initial growth. *Suranaree Journal of Science and Technology.* **4**: 23-28.

Tannock, G.W. 1992. Molecular genetic and probiotics. *In* D.A. Leger, and S.K. Ho (eds.). *Proceedings of the International Roundtable on Animal Feed Biotechnology-Research and Scientific Regulation*, Ottawa, Canada. February 1992. pp. 111-119.

Tannock, G.W., A. Tilsala-Timisjarvi, S. Rodtong, J. Ng, K. Munro, and T. Alatossava. 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(9): 4264-4267.

Tüller, G., G. Armbruster, S. Wiedenmann, T. Hänichen, D. Schams, and J.Bauer. 1998. Occurrence of roquefortine in silage-toxicological relevance to sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. **80**: 246-249.

Weinberg, Z.G., G. Ashbell, Y. Hen, and A. Azrieli. 1993. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability silages. *Journal of Applied Bacteriology*. **75**: 512-518.

West, C.A., and P.J. Warner. 1988. Plantacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. *FEMS Microbiology Letters*. **49**: 163-165.

Woolford, M.K. 1984. Techniques employed in the analysis of silage. *In* M.K. Woolford. *The Silage Fermentation* (pp. 299-323). New York: Marcel Dekker, Inc.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สีย้อมจุลินทรีย์

1. Crystal violet (Gram stain)

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethanol (95%)	20.0	มิลลิลิตร
ละลายให้เข้ากัน แล้วจึงเติม		
Ammonium oxalate (1% Aqueous solution)	80.0	มิลลิลิตร

2. Safranin (Gram stain)

Safranin O (2.5% solution ใน 95% Ethanol)	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90.0	มิลลิลิตร
ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้ทุกครั้ง		

ภาคผนวก ข น้ำยาเคมี

1. Acetone alcohol

Alcohol (95%)	700.0	มิลลิลิตร
Acetone	300.0	มิลลิลิตร
ผสมให้เข้ากัน		

2. Hydrogen peroxide (3% solution)

Hydrogen peroxide	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

3. Iodine solution (Gram's iodine)

Iodine	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม
ละลายสารทั้งสองชนิดในน้ำ โดยค่อยๆ เติมน้ำทีละน้อย		
จนกระทั่ง Iodine ละลายหมด		
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	300.0	มิลลิลิตร

เก็บไว้ในขวดสีชา

4. Loading buffer

Sucrose	4.0	กรัม
Bromophenol blue	0.25	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

เก็บที่ 4°ซ.

5. Lysis buffer

25% Sucrose

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA

6. TBE buffer (pH 8.0)

89 mM Tris-HCl

89 mM Boric acid

2 mM EDTA

7. TE buffer

10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

1 mM EDTA

8. TES buffer

5 mM Tris-HCl (pH 8.0)

5 mM Sodium chloride

0.5 mM EDTA

9. Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (1%)

Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลาย Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตรใน Volumetric flask เก็บไว้ในขวดสีชา

ภาคผนวก ค อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

1. MRS broth / MRS agar

Peptone (จาก Casein)	10.0	กรัม
Meat extract	8.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
D(+)-Glucose	20.0	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
di-Ammonium hydrogen citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.04	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

pH 5.7

กรณี MRS agar ให้เติม Agar 15.0 กรัม ละลายส่วนผสมและฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 118°ซ. เป็นเวลา 15 นาที

สามารถเตรียมได้จากอาหารมีส่วนผสมที่ผู้ผลิตผลิตเพื่อจำหน่าย เช่น Rogosa agar (MERCK, Merck KGaA, Germany)

2. MRS fermentation broth

Polypeptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Sodium acetate-anhydrous	3.0	กรัม
tri-Ammonium citrate	2.0	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$MnSO_4.4H_2O$	0.05	กรัม
Bromocresol purple	0.15	กรัม
น้ำกลั่น	800.0	มิลลิลิตร

pH 6.9-7.0

แบ่งบรรจุขวดหรือหลอดๆ ละ 6 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที

3. Rogosa agar (Lactobacillus selective agar)

Peptone (จาก Casein)	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
D(+)-Glucose	20.0	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	6.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
Sodium acetate	15.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.575	กรัม
Fer(II) sulfate	0.034	กรัม
Manganese sulfate	0.12	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

pH 5.5

ละลายส่วนผสมและหลอม Agar ให้ความร้อนใน Water bath น้ำเดือด หรือ ไอน้ำร้อน ห้ามนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 5.5 ด้วย Acetic acid (96%) แล้วแบ่งบรรจุในจานเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อ

สามารถเตรียมได้จากอาหารมีส่วนผสมที่ผู้ผลิตผลิตเพื่อจำหน่าย เช่น Rogosa agar (MERCK, Merck KGaA, Germany)

ประวัติผู้วิจัย

1. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง
SUREELAK RODTONG

ที่อยู่ : สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ (044) 22 4297
โทรสาร (044) 22 4185
E-mail sureelak@ccs.sut.ac.th

ประวัติการศึกษา :

ปี พ.ศ. ที่จบ	คุณวุฒิ	ชื่อสถานศึกษา
2524	วท.บ. (ชีววิทยา เลือกจุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
2527	วท.ม. (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
2533	Postgraduate Diploma in Science (Biotechnology) with credit	University of Otago, New Zealand
2536	Ph.D. (Microbiology)	University of Otago, New Zealand

ประสบการณ์การทำงาน :

พฤษภาคม 2527-พฤษภาคม 2537	อาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พฤษภาคม 2537-เมษายน 2539	อาจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ตุลาคม 2542-กันยายน 2543	หัวหน้าสถานวิจัย สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
พฤศจิกายน 2542-กันยายน 2543	เลขานุการ คณะกรรมการประจำสำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
เมษายน 2539-ปัจจุบัน	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานทางวิชาการ : งานวิจัยบางส่วน (วารสาร/การประชุมวิชาการ)

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2531. การผลิตเบต้า-คาโรทีนโดยยีสต์ (*Rhodotorula pallida*). *วารสารวิทยาศาสตร์ มข.* **16**: 53-56.

สิรินทรเทพ เต้าประยูร วิภาพร ศรีพรหมยา และ **สุรีลักษณ์ รอดทอง**. 2530. ผักตบชวาและยีสต์โปรตีนสูงสำหรับเป็นอาหารสัตว์. *วารสารวิทยาศาสตร์ มข.* **15**: 53-57.

Rodtong, S., P. Sunthornandh, B. Yongsmith, and L. Maksongsri. 1985. Selection of antibacterial antibiotic-producing actinomycetes from Thai soils. *Microbial Utilization of Renewable Resources*. **4**: 327-334.

Rodtong, S., and G. W. Tannock. 1993. Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**(10): 3480-3484.

Rodtong, S., G. W. Tannock, and K. H. Wilson. 1993. Nucleotide sequence of the 16S ribosomal RNA gene of *Lactobacillus reuteri* DSM 20016. The Nucleotide Sequence Databank (GenBank [USA]). Accession No. L23507.

Rodtong, S., S. Dobbinson, S. Thode-Andersen, M. A. McConnell, and G. W. Tannock. 1993. Derivation of DNA probes for the enumeration of a specific strain of *Lactobacillus acidophilus* in piglet digestive tract samples. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**(11): 3871-3877.

Rodtong, S., A. Hewson, J. Lynch, and S. De Grandis. 1997. Direct polymerase chain reaction detection of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in raw milk. *Abstracts of The 2nd JSPS-NRCT-DOST-LIPI-VCC Seminar, 19-21 November 1997, Nakhon Ratchasima, Thailand*: 187.

Rodtong, S., A. Hewson, J. Lynch, and S. De Grandis. 1997. Polymerase chain reaction detection of coagulase gene of mastitic *Staphylococcus aureus* in Ontario, Canada. *Abstracts of The 2nd JSPS-NRCT-DOST-LIPI-VCC Seminar, 19-21 November 1997, Nakhon Ratchasima, Thailand*: 186.

Rodtong, S., N. Teaumroong, and P. Chooklay. 1998. A preliminary study on the diversity of macrofungi in Nong-rawieng Plant Genetics Forest. *Proceedings of The Asia-Pacific Mycological Conference on Biodiversity and Biotechnology, 6-9 July 1998, Hua Hin, Thailand*: 281-284.

Rodtong, S., C. Burom, N. Teaumroong, and N. Boonkerd. 1999. Glycerol and mannitol production from yeasts for *Rhizobium* inoculum cultivation. *Abstracts of The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999, 15-18 November 1999, Phuket, Thailand*: 208.

Rodtong, S., S. Thienhirun, and A.J.S. Whalley. 2000. New and interesting *Xylariaceae* from Tup Lan National Park. *Abstracts of The Tropical Mycology 2000, 25-29 April 2000, Liverpool, U.K.*: 30.

Rodtong, S., and N. Teaumroong. 2000. Edible mushrooms in dry dipterocarp forest of Tup Lan National Park in Thailand. *Abstracts of The Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000, Hong Kong Sar, China*: 105.

Rodtong, S., P. Krubphachaya, and N. Teaumroong. 2000. *Lactobacillus* strains in natural Thai silage for applying as silage inoculants and probiotics. *Abstracts of The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, 1-3 November 2000, Kanchanaburi, Thailand*: 77 (P-AB-13).

Rodtong, S., C. Wanapu, and A. Ishizaki. 2000. Starch-utilizing bacteria for L-lactic acid production. *Abstracts of The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, 1-3 November 2000, Kanchanaburi, Thailand*: 52 (O-IB-1).

Rodtong, S., and A. Ishizaki. 2000. Microbial conversion of cassava starch to L-lactic acid without carbon dioxide accumulation. *The first Regional Conference on Energy Technology Towards a Clean Environment, 1-2 December 2000, Chiang Mai, Thailand*: P14-EN039.

Rodtong, S. 2001. Bacterial strains for the direct production of L-lactic acid from cassava and sago starch. *Proceedings of The International Symposium on "Diversity and Optimum Utilization of Biological Resources in the Torrid and Subtropical Zones", 2 June 2001, Kyushu, Japan*: 4-8.

Rodtong, S. 2001. Detection and sequence analysis of the gene encoding L-lactate dehydrogenase from starch-utilizing bacteria. *Abstracts of The BioThailand 2001: From Research to Market, 7-10 November 2001, Bangkok, Thailand*: 227 (P-Micro-Genetic-13).

Rodtong, S., J. Sansit, P. Chimsoongnern, K. Vechklang, and A. Ishizaki. 2001. Strain improvement of starch-utilizing bacteria by mutagenesis to enhance L-lactic acid production. *Abstracts of The BioThailand 2001: From Research to Market, 7-10 November 2001, Bangkok, Thailand*: 226 (P-Micro-Genetic-12).

Chumkhunthod, P., **S. Rodtong**, N. Teaumroong, and N. Boonkerd. 2001. Bioconversion of cassava roots to high protein product for animal feed. *Thai Journal of Biotechnology*. **3**(1): 17-25.

Green, D. H., G. D. Lewis, **S. Rodtong**, and M. W. Loutit. 1991. Detection of faecal pollution in water by an *Escherichia coli uid*A gene probe. *Journal of Microbiological Methods*. **13**: 207-214.

Reynolds, C., M. Donovan, **S. Rodtong**, and A.J.S. Whalley. 2000. Characterisation of fungal and other lectins: an overview. *Abstracts of The Tropical Mycology 2000, 25-29 April 2000, Liverpool, U.K.*: 8.

Tannock, G. W., A. Tilsala-Timisjarvi, **S. Rodtong**, J. Ng, K. Munro, and T. Alatossava. 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(9): 4264-4267.

Teaumroong, N., M. Manassila, N. Boonkerd, and **S. Rodtong**. 2000. ITS-RFLP analyses of edible mushrooms in genera *Russula* and *Boletus* collected from North Eastern part of Thailand. *Abstracts of The Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000, Hong Kong Sar, China*: 115.

Walter, J., G. W. Tannock, A. Tilsala-Timisjarvi, **S. Rodtong**, D. M. Loach, and K. Munro. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**(1): 297-303.

2. รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

Neung Teaumroong

NATIONALITY	: Thai
SEX	: Male
DATE AND PLACE OF BIRTH	: July 21 1965, Bangkok
POSITION	: Head of Research Department Institute of Agicultural Technology (April 1999-present:Associate Professor)
ADDRESS	: School of Biotechnology Institute of Agricultural Technology Suranaree University of Technology Nakhon Ratchasima, THAILAND 30000 E-mail : neung@ccs.sut.ac.th Fax : 66-44-224150, 216345

EDUCATION

1987	B.Sc.	Microbiology, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
1989	M.Sc.	Industrial Microbiology, Chulalongkorn University, Thailand
1990	Dipl.	Microbiology and Biotechnology, University of Tokyo, Japan
1993	Dr.rer.nat	Microbiology and Molecular Biology, University of Innsbruck, Austria

CURRENT RESEARCH

: Development of Detection System for Soil Bacteria by Using DNA Direct Extraction Method
: Application of Primer-Based Technology to Fingerprint the Genomes of Rhizobia
: Study of Rhizobial Behavior By Using the Molecular Genetics Approaches
: Biodiversity of N_2-Fixing Microorganisms and VAM in Thailand
: Biodiversity of Wild Mushrooms in North-East Area of Thailand
: Mannitol Production for Rhizobium Cultivation from Agricultural Waste

RESEARCH FUNDING

: Monbusho (1993-1994)
"Breeding of Nitrogen Fixing Bacteria in Southeast Asia "
: International Atomic Energy Agency (IAEA) (1993-1995)
"Using Molecular Biology Techniques to Detect Rhizobium in Thailand"
: Japan Society Promotion of Science and National Research Council of Thailand (JSPS-NRCT) (1995-1998)
"Rhizobial Strain Improevment and on Farm Management for High N_2 Fixation in Forage Legumes"
: Biodiversity Research&Training Program (BRT)(1996-1999)
"Population Changes in N_2-Fixing Microorganisms as Affected by Changing in Ecosystem Process"
: HRH Princess Sirindhorn Plant Conservation Project (1996-2000)
"Mushroon Diversity in Tub-Lan National Park"
: Suranaree University of Technology (1993-1997)
"Using Gus Gene for Studying Rhizobial Behavior in Ecosystem"
"Development of Detection System for Soil Bacteria Using DNA Probe Technique"
"DNA Fingerprint of Wild Edible Mushrooms in Northeastern Part of Thailand"
: Japan Society Promotion of Science and National Research Council of Thailand

(JSPS-NRCT) (2000-2003)
"Development of techniqe for nitrogen fixing and phosphorus uptake microorganisms in legumes by using molecular genetics approaches."

PUBLICATIONS

Teaumroong, N., and S. Pichayangura. (1989). Detection of Polysaccharides from some Mushrooms. J. of Microbial Utilization of Renewable Resources. Vol.6, P.126-128.

Chung, S.-Y., Yokoyama, K., Gomo, M., Teaumroong, N., Ishii, M., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1994). Purification and some properties of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Pseudomonas hydrogenothermophila* strain TH-1. J. Ferment. Bioeng., 78, 469-47.

Teaumroong, N., Y. Murooka and N. Boonkerd. (1995) Acid Tolerance and Antibiotic Resistance of Some Strains of *Bradyrhizobium* applied in Thailand. Suranaree J. Sci. Technol Vol.2, P. 75-80.

Teaumroong, N., N. Boonkerd and Y. Murooka. (1995) Application of primer based technology to fingerprint the genomes of *Bradyrhizobium* spp. Used in Thailand :In Processding of the 10th International Congress on Nitrogen fixation, St. Petersburg, Russia May 28-June 3, p. 741.

Teaumroong N. and N. Boonkerd (1996). Iron Element, Siderophores and Microbes. Suranaree J. Sci.Technol. 3:95-100.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd. (1996). Symbiotic Relationship Between Rhizobia and Legumes in Molecular Genetic Aspect. Suranaree J. Sci. Technol. 3:15-20

Teaumroong, N., N. Boonkerd and K. Haselwandter (1996) Effect of the iron sources on the siderophore produced from *Bacillus polymyxa*. Suranaree J. Sci. Technol. 3:133-137

Boonkerd N., N. Teaumroong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong and A. Nantagij. 1996. Rhizobial strain improvement and on-fram management for high N_2 fixation in Thailand; Isolation of forage legume rhizobia. Annual Report of IC Biotech. 19:839-844.

Teaumroong N, K. Teamtaisong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, A. Nantagij. and N. Boonkerd. 1997. Rhizobial strain improvement and on-fram management for high N_2 fixation in forage legumes; Screening of high effective rhizobial strains. Annual Report of IC Biotech. 20:955-962.

Teaumroong, N.,C. Schuarzer, B. Auer and K. Haselwandter. 1997. A non-radioactive DNA probe for detecting dicyandiamide - degrading soil bacteria. Biology and Fertility of Soils.25,159 - 161.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd. (1998). Using reporter gene system to monitor applied *Bradyrhizobium* in Thailand. In Proceeding of the 11th International Congress on Nitrogen fixation, Institute Pasteur, Paris, France, July 2-25, 1997. p. 660

Boonkerd, N., N. Teaumroong and G. Hardarson (1998). Effect of inoculation methods on nodulation, N_2 fixation and yield of soybeans under field condition. In Proceeding of the 11th International Congress on Nitrogen fixation, Institute Pasteur, Paris, France, July 2-25, 1997. p. 631

Teaumroong, N., K. Teamtisong, M. Manassila and N. Boonkerd.(1998). Preliminary Study of The Competition and Persistence of Applied *Bradyrhizobia* Strains Using Reporter Gene in Soil. Suranaree J. Sci. Technol 5:18-23.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd (1998). Detection of *Bradyrhizobium* spp. and *B. japonicum* in Thailand by Primer-Based Technology and Direct DNA Extraction. Plants and Soil. 204:127-134.

Boonkerd, N., N. Teaumroong and G. Hardarson (1998). Nitrogen Fixation (^{15}N Dilution) in Soybean as Affected by Inoculation Methods : In Asian Network on Microbial

Researches. Gadjah Mada University (GMU), The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN) Science and Technology Agency, Japan. P. 165-171.

Rodtong, S., N. Teaumroong and P. Chooklay (1998). A preliminary study on the diversity of macrofungi in Nong-Rawieng plant genetic forest: In proceeding of the Asia-Pacific Mycological Conference on "Biodiversity and Biotechnology" 6-9 july 1999, Hua-Hin, Thailand. P.281-284.

Teaumroong N., K. Teamtaisong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, A. Nantagij. and N. Boonkerd. (1999). Strain selection and characterization of rhizobia isolated from forage legumes grown in Thailand. Annual Report of IC Biotech.

Teaumroong N., K. Teamtaisong, A. Nantagij, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, and N. Boonkerd. (2000). Diversification of some forage legumes rhizobia isolated in Thailand. In:Proceeding of the 12th International congress on nitrogen fixation [F.O. Pedrosa et al. (eds.)], Foz do Iguacu, Parana, Brazil. September 12-17, 1999.Kluwer Academic Publishers. p.196

Teaumroong, N., M. Manassila, N. Boonkerd, and S. Rodtong. 2000. ITS-RFLP analyses of Edible mushrooms in genera Russula and Boletus collected from North Easter part of Thailand. *Abstracts of the Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000, Hong Kong Sar, China*: 115.

INSTRUCTIONAL EXPERTISE

- Applied Microbiology
- Man and Environment
- Environmental Microbiology
- Agricultural Biotechnology
- Biosafety
- Food Microbiology
- Fermented Food Products
- Molecular Biology and Recombinant DNA Technology

PROFESSIONAL SOCIETIES

: Thai Society of Biotechnology
: Thai Inventor Association

SELECTED PAPER PRESENTATION

- NRCT; NUS; DOST-JSPS. Joint Seminar on Biotechnology. December 22-24 1988, Chiang Mai University. (**Oral presentation:** in "Detection of Polysaccharides From Some Edible Mushrooms.")
- International Symposium on Microbial Ecology (ISME-6), September 6-11, 1992. Barcelona, Spain. (**Poster presentation** in "DNA Direct Extraction from Soil to Detect DCD-Degrading Soil Bacterium.")
- The 3rd FAO/IAEA Research co-ordination meeting on " Enhancing Soil Fertility and Crop Production by Better Management of *Rhizobium*". (**Oral presentation** in " Using Molecular Biology to Detect Rhizobia in Agro-Ecosystem"). University de Geneve, Geneva, Switzerland. August 15-19, 1994.
- 10th International Congress on Nitrogen Fixation. ST. Petersburg, Russia. May 28-June 3, 1995. (**Poster presentation**: in "Application of Primer-Based Technology to Fingerprint the Genomes of *Bradyrhizobium* spp. in Thailand")
- Biotechnology Research and Applications for Sustainable Development (BRASD). Central Plaza Hotel, Bangkok, Thailand. August 7-10, 1996. (**Oral presentation** : in "Using Molecular Biology Techniques to Fingerprint the Genomes and Study Behavior of *Bradyrhizobium* in Agro-Ecosystem.")
- Research co-ordination meeting on "Enhancing Soil Fertility and Crop Production by Better Management of Rhizobium" (FAO/IAEA). 2-6 Sep. 1996, UN, Vienna, Austria (**Oral presentation** : "The Detection System to Monitor Applied *Bradyrhizobium* in Soil")
- Project of JSPS-NRCT "Seminear on Cooperative research of biotechnology between Thailand and Japan". Nov. 27, 1996. (**Oral presentation** : in "Application of Reporter Gene System to Detect Rhizobial Behavior.")
- 11th International Congress on Nitrogen Fixation. 20-25 Jul.1997 Institue Pasteur, Paris (**Poster presentation**: in "Using Gus Reporter Gene to Detect Applied *Bradyrhizobium* in the Field and Effect of Inoculantion Methods on Nodulation, N_2 fixation and Yield of Soybeans Under Field Condition.")
- Asia-Pacific Mycological Conference on "Biodiversity and Biotechnology" 6-9 Junly 1998. Hua-Hin, Thailand. (**Poster presentation** : in "A preliminary study on the diversity of macrofungi in Nong-Rawieng plant genetic forest.")

3. นายพงษ์ฤทธิ์ ครบปรัชญา

PONGRIT KRUBPHACHAYA

ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ. ที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2532	ตรี	วท.บ. วิทยาศาสตร์บัณฑิต	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย

เอกสารแนบ

ผลงานวิจัยในส่วนที่เกี่ยวข้อง ที่ได้นำเสนอในที่ประชุมวิชาการ และตีพิมพ์ในวารสาร

1. **Rodtong, S.**, P. Krubphachaya, and N. Teaumroong. 2000. *Lactobacillus* strains in natural Thai silage for applying as silage inoculants and probiotics. *Abstracts of The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, 1-3 November 2000, Kanchanaburi, Thailand*: 77 (P-AB-13).

2. Tannock, G. W., A. Tilsala-Timisjarvi, **S. Rodtong**, J. Ng, K. Munro, and T. Alatossava. 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(9): 4264-4267.

Lactobacillus Strains in Natural Thai Silage for Applying as Silage Inoculants and Probiotics

Sureelak Rodtong[1], Pongrit Krubphachaya[2], and Neung Teaumroong[3]

[1]School of Microbiology, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

[2]Center for Scientific and Technological Equipment, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

[3]School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

Lactic acid bacteria are central to the silage fermentation. The production of acids, principally lactic acid, by lactic acid bacteria from the anaerobic fermentation of forage carbohydrate is responsible for the acidification of the forage and its subsequent preservation. Successful inoculation of the plant with lactic acid bacteria is one of the principal factors to achieve the successful preservation. To obtain *Lactobacillus* strains in natural Thai silage for applying as silage inoculants and probiotics in local areas, three hundred-seventy isolates of lactobacilli were isolated from silage collected from six silage production areas of the main cattle farms in Thailand. These isolates were identified as to groups of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus farciminis*, and *Lactobacillus gassari* by traditional phenotypic tests, then selected for the confirmation of species using PCR identification systems based on the 16S-23S rRNA intergenic region for *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* which were the dominant species in the natural silage samples. At least three strains of *Lactobacillus plantarum* were found when the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method was used for differentiating lactobacillus strains. The dominant strains in silage were selected for applying as silage inoculants and, possibly as probiotics for the same strain. Some species, such as *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus reuteri*, have been reported in literatures as probiotic lactic acid bacteria. The production of silage both with and without adding inoculants, as well as the investigation of the survival of silage inoculants in the digestive tract of cattle has been being carried out. These studies would be benefit to the preservation and production of cattle feed, and also to Suranaree University of Technology Business Farm where has been being produced animal feed for utilizing in the farm and distributing to other farms nearby.

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Sept. 1999, p. 4264–4267 Vol. 65, No. 9
0099-2240/99/$04.00+0
Copyright © 1999, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Identification of *Lactobacillus* Isolates from the Gastrointestinal Tract, Silage, and Yoghurt by 16S-23S rRNA Gene Intergenic Spacer Region Sequence Comparisons

G. W. TANNOCK,[1]* A. TILSALA-TIMISJARVI,[2] S. RODTONG,[3] J. NG,[1] K. MUNRO,[1] AND T. ALATOSSAVA[2,4]

Department of Microbiology, University of Otago, Dunedin, New Zealand[1]; Department of Biology, University of Oulu, Oulu,[2] and Biotechnology Laboratory, REDEC of Kajaani, University of Oulu, Sotkamo,[4] Finland; and School of Microbiology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand[3]

Received 16 February 1999/Accepted 1 July 1999

***Lactobacillus* isolates were identified by PCR amplification and sequencing of the region between the 16S and 23S rRNA genes (spacer region). The sequences obtained from the isolates were compared to those of reference strains held in GenBank. A similarity of 97.5% or greater was considered to provide identification. To check the reliability of the method, the V2-V3 region of the 16S rRNA gene was amplified and sequenced in the case of isolates whose spacer region sequences were less than 99% similar to that of a reference strain. Confirmation of identity was obtained in all instances. Spacer region sequencing provided rapid and accurate identification of *Lactobacillus* isolates obtained from gastrointestinal, yoghurt, and silage samples. It had an advantage over 16S V2-V3 sequence comparisons because it distinguished between isolates of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus*.**

The members of the genus *Lactobacillus* are gram-positive organisms that belong to the general category of lactic acid bacteria. They inhabit a wide variety of habitats, including the gastrointestinal tracts of animals and vegetation, and are used in the manufacture of fermented foods (8). Interest in the lactobacilli has been stimulated in recent years by the use of these bacteria in products that are claimed to confer health benefits on the consumer (probiotics) (4).

The identification of *Lactobacillus* isolates by phenotypic methods is difficult because it requires, in several cases, determination of bacterial properties beyond those of the common fermentation tests (for example, cell wall analysis and electrophoretic mobility of lactate dehydrogenase) (8). In general, about 17 phenotypic tests are required to identify a *Lactobacillus* isolate accurately to the species level (6). The derivation of simple yet rapid identification methods is therefore required in order to deal with the large numbers of *Lactobacillus* isolates obtained during microbial ecological studies of ecosystems such as the intestinal tract, silage, and food products.

Nucleotide base sequences of *Lactobacillus* 16S ribosomal DNA (rDNA) provide an accurate basis for phylogenetic analysis and identification (2, 5, 17). The sequence obtained from an isolate can be compared to those of *Lactobacillus* species held in data banks. Although the species-specific sequences are contained in the first half of the 16S rRNA gene (V1-V3 region), identification is more accurate if the whole gene is sequenced (13). This means that about 1.5 kb of DNA would have to be sequenced.

Studies by Tilsala-Timisjarvi and Alatossava (15), Berthier and Ehrlich (3), Nour (11), and Nakagawa and colleagues (10) have demonstrated that the DNA sequence between the 16S and 23S genes of lactobacilli is hypervariable. This intergenic spacer region is about 200 bases in length if tRNA genes are absent (small spacer sequence) (3). The 16S-23S spacer sequences of lactobacilli are sufficiently species specific for the derivation of PCR primers that can be used to identify *Lactobacillus* species (3, 10, 15).

Because a relatively large number of different species (at least 18 from monogastric animals) have been described as intestinal inhabitants (9), identification of lactobacilli by PCR using sets of specific primers is daunting logistically. We have therefore sequenced the 16S-23S small spacer regions of *Lactobacillus* isolates and compared them to the sequences of type cultures and other valid strains recorded in GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Md.). Our results show that this is a relatively simple and rapid method by which lactobacilli can be identified without resorting to the use of species-specific PCR primers.

Twenty-eight intestinal isolates (from human feces, rodent gastrointestinal samples, and porcine gastrointestinal contents), 10 isolates from probiotic yoghurts retailed in Dunedin supermarkets, and 2 silage isolates from Thailand were used in the study (Table 1). They were determined to belong to the genus *Lactobacillus* by culture on Rogosa SL agar (Difco Laboratories, Detroit, Mich.), Gram stain appearance, catalase test, and determination of fermentation products by gas-liquid chromatography (7). The 16S-23S intergenic spacer region from each isolate was amplified by using primers (15) that annealed to conserved regions of the 16S and 23S genes (primer 16-1A, 5′-GAATCGCTAGTAATCG-3′, corresponding to nucleotides 1361 to 1380 of the 16S rRNA gene according to *Lactobacillus casei* numbering [18]; primer 23-1B, 5′-GGGTT CCCCCATTCGGA-3′, corresponding to nucleotides 123 to 113 of the 23S rRNA of *L. casei* [10]). PCR mixtures contained 5 μl of 10× polymerase buffer (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany), 200 μM each deoxynucleoside triphosphate, 80 pM each primer, 2 μl of *Lactobacillus* cell suspension (a few colonies emulsified in sterile MilliQ [Millipore Corp.] water), and 2.6 U of Expand High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim) DNA polymerase in a total volume of

* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, University of Otago, P.O. Box 56, Dunedin, New Zealand. Phone: 64-3-479-7713. Fax: 64-3-479-8540. E-mail: gerald.tannock@stonebow.otago.ac.nz.

TABLE 1. *Lactobacillus* isolates identified on the basis of percent similarity to 16S-23S small spacer region sequences in GenBank

Isolate	Source	GenBank accession no. of 16S-23S sequence	Species identification based on 16S-23S sequence	% Similarity of 16S-23S sequence to that of reference strains in GenBank	GenBank accession no. of V2-V3 sequence	Species identification based on sequence of 16S V2-V3 region
GTH1	Human	AF158557	*L. salivarius* subsp. *salivarius*	100.0	NA[a]	ND[b]
GTH2	Human	AF158558	Unidentified	NA	AF157030	*W. confusa*
GTH5	Human	AF158559	*L. gasseri*	98.6	AF157044	*L. gasseri*
GTH6	Human	AF158560	*L. gasseri*	98.2	AF157033	*L. gasseri*
GTH7	Human	AF158561	*L. ruminis*	99.5	NA	ND
GTH8	Human	AF158562	Unidentified	NA	AF157045	*W. confusa*
GTH10	Human	AF158563	*L. fermentum*	99.0	NA	ND
GTH13	Human	AF158564	*L. rhamnosus*	99.5	NA	ND
GTH15	Human	AF158565	*L. casei*	99.5	AF157043	*L. casei* group
GTH17	Human	AF158566	*L. rhamnosus*	99.5	NA	ND
GTH18	Human	AF158567	*L. brevis*	98.2	AF157038	*L. brevis*
GTH20	Human	AF158568	*L. rhamnosus*	99.5	NA	ND
GTH22	Human	AF158569	Unidentified	NA	AF157037	*W. confusa*
GTH24	Human	AF158570	Unidentified	NA	AF157031	*W. confusa*
GTH26	Human	AF158571	Unidentified	NA	AF157034	*W. confusa*
GTH28	Human	AF158572	*L. ruminis*	98.6	AF157032	*L. ruminis*
GTH29	Human	AF158573	*L. gasseri*	98.6	AF157039	*L. gasseri*
GTH30	Human	AF158574	*L. casei*	99.1	AF157042	*L. casei* group
GTH32	Human	AF158575	*L. rhamnosus*	100.0	NA	ND
GTH33	Human	AF158576	*L. fermentum*	99.5	NA	ND
JN1	Yoghurt	AF158577	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	98.5	AF157040	*L. delbrueckii*
JN2	Yoghurt	AF158578	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	99.5	NA	ND
JN3	Yoghurt	AF158579	*L. helveticus*	99.5	NA	ND
JN4	Yoghurt	AF158580	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	98.6	AF157041	*L. delbrueckii*
JN5	Yoghurt	AF158581	*L. acidophilus*	100.0	NA	ND
JN6	Yoghurt	AF158582	*L. acidophilus*	100.0	NA	ND
JN7	Yoghurt	AF158583	*L. acidophilus*	100.0	NA	ND
JN8	Yoghurt	AF158584	*L. helveticus*	99.5	NA	ND
JN9	Yoghurt	AF158585	*L. acidophilus*	100.0	NA	ND
JN10	Yoghurt	AF158586	*L. rhamnosus*	100.0	NA	ND
GTP1	Pig	AF158587	*L. crispatus*	100.0	NA	ND
GTP2	Pig	AF158588	*L. crispatus*	100.0	NA	ND
GTP3	Pig	AF158589	*L. crispatus*	100.0	NA	ND
GTP4	Pig	AF158590	*L. reuteri*	100.0	NA	ND
GTP5	Pig	AF158591	*L. crispatus*	98.5	AF157035	*L. crispatus/L. gallinarum*
GTP6	Pig	AF158592	*L. crispatus*	100.0	NA	ND
SR1	Silage	AF158593	*L. pentosus/L. plantarum*	99.5	NA	ND
SR2	Silage	AF158594	*L. pentosus/L. plantarum*	97.5	AF157036	*L. pentosus/L. plantarum*
GTR1	Mouse	AF158595	*L. reuteri*	100.0	NA	ND
GTR3	Rat	AF158596	*L. reuteri*	100.0	NA	ND

[a] NA, not applicable.
[b] ND, not done.

50 μl. The PCR program began with a preincubation at 94°C for 2 min. The amplification profile was 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 30 s. This was repeated for 30 cycles. The program finished with a 5-min incubation at 72°C. PCR products were electrophoresed in a 1% agarose gel and visualized by UV transillumination after being stained in ethidium bromide solution (5 μg/ml). *Lactobacillus* species frequently contain both small and large spacer regions, in which case the smallest product (about 500 to 600 bp) was excised from the gel and extracted by using a QIAEX kit (Qiagen, Hilden, Germany). The extract was used in a repeat PCR amplification, and the resulting DNA was purified from primers and unincorporated nucleotides by using a QIAquick kit (Qiagen). Both polynucleotide strands of the purified DNA were sequenced, using 16-1A and 23-1B as forward and reverse primers, respectively. Sequencing was carried out either at the Centre for Gene Research, University of Otago, by the dideoxy method of Sanger et al. (12), using a PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif.) in combination with an Applied Biosystems model 377A automated sequencing system, or manually by using a Circum Vent Thermal Cycle Dideoxy kit (New England Biolabs, Beverly, Mass.). Analysis of nucleotide sequence data was carried out by using the SeqEd program, version 1.0.3 (Applied Biosystems Inc.). Further sequence editing and analysis were carried out with either EditSeq version 3.98 (DNA Star Inc., Madison, Wis.) and Megalign version 3.1.7 (DNA Star Inc.) or LKB DNASIS (version 7.0). The small intergenic spacer region sequences obtained by these methods were compared to sequences from type culture and other *Lactobacillus* strains held in GenBank (Table 2).

To test the reliability of the method, we extracted DNA from *L. acidophilus* ATCC 4356^T on five separate occasions and sequenced the amplified 16S-23S spacer region. The five sequences were 100.0% similar to each other, as well as to the sequence held in GenBank.

Comparisons of 16S-23S small spacer region sequences held in GenBank showed that all were less than 97.5% similar except for *L. salivarius* subsp. *salivarius* and *L. salivarius* subsp. *salicinius* (98.6% similar), *L. plantarum* and *L. pentosus* (99.0% similar), and *L. curvatus* and *L. graminis* (98.6% similar). With these exceptions, in which small spacer region sequences can only aid in grouping isolates, we arbitrarily chose a value for similarity between sequences of 97.5% or greater to indicate

TABLE 2. GenBank *Lactobacillus* 16S-23S intergenic spacer region sequences used to identify isolates

Species	Strain[a]	GenBank accession no.
L. acidophilus	ATCC 4356^T	U32971
L. brevis	IFO 13110	X74221
L. casei	ATCC 334^T	AF121200
L. crispatus	ATCC 33820^T	AF074857
L. curvatus	DSM 20019^T	U97129
L. delbrueckii subsp. *bulgaricus*	ATCC 11842^T	AF113602
L. delbrueckii subsp. *lactis*	ATCC 15808	U32968
L. fermentum	ATCC 14931^T	AF080099
L. gasseri	ATCC 33323^T	AF074859
L. graminis	DSM 20719^T	U97130
L. hamsteri	ATCC 43851^T	AF113601
L. helveticus	ATCC 15009^T	U32970
L. johnsonii	ATCC 33200^T	AF074860
L. pentosus	ATCC 8041^T	U97134
L. plantarum	ATCC 14917^T	AF080101
L. reuteri	DSM 20016^T	AF080100
L. rhamnosus	ATCC 7469^T	AF121201
L. ruminis	ATCC 277780^T	AF080103
L. sake	ATCC 15521^T	U97131
L. salivarius subsp. *salicinius*	ATCC 11742^T	AF080102
L. salivarius subsp. *salivarius*	ATCC 11741^T	AF113600
L. sharpeae	DSM 20505^T	AF074861
L. zeae	ATCC 393^T	AF074862

[a] ATCC, American Type Culture Collection, Manassas, Va.; DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany; superscripted T, type culture.

species identity. This cutoff value is supported by the observation that in cases where 16S rDNA sequence (whole gene) homologies are below about 97%, it is unlikely that two organisms have more than 60 to 70% DNA similarity and, hence, that they are related at the species level (13).

Comparisons of 16S-23S small spacer region sequences obtained from *Lactobacillus* isolates with those held in GenBank enabled the identification of 35 of 40 isolates (Table 1). Intergenic spacer region sequences from isolates GTH2, GTH8, GTH22, GTH24, and GTH26 did not correspond to sequences in the data bank. Nine isolates (GTH5, GTH6, GTH18, GTH28, GTH29, JN1, JN4, GTP5, and SR2) had spacer sequences that were between 97.5 and 99.0% similar to sequences in the database. To confirm that the cutoff similarity value used (97.5%) was valid, we amplified and sequenced (one polynucleotide strand only) the V2-V3 regions of the 16S rRNA genes of these isolates and conducted a search of sequences deposited in the GenBank DNA database by using the BLAST algorithm (1). Amplification of the V2-V3 region was accomplished by using primers HDA1 (5′-ACTCCTACGGG AGGCAGCAGT-3′) and HDA2 (5′-GTATTACCGCGGCT GCTGGCAC-3′), described by Turner et al. (16), and the thermal cycler program described above. The PCR product corresponded to positions 339 to 539 in the *Escherichia coli* gene. BLAST searches confirmed the identities (on the basis of highest score) obtained by spacer sequence analysis of all nine isolates and identified isolates GTH8, GTH26, GTH2, GTH22, and GTH24 as *Weissella confusa* (previously known as *Lactobacillus confusus*), for which the 16S-23S spacer region of the type culture is not yet available (Table 1). Additionally, we sequenced the V2-V3 regions of GTH15 and GTH30, which had been identified as *L. casei* on the basis of spacer region sequence. The highest scores for the V2-V3 sequence, for both isolates, were obtained for members of the *L. casei* group (*L. casei*, *L. paracasei*, and *L. rhamnosus*).

Our study shows that comparison of the percentages of similarity of 16S-23S spacer region sequences of lactobacilli provides a practical method of strain identification. The small 16S-23S spacer sequences of lactobacilli are about 200 bp in length. These relatively short sequences can be easily sequenced on both polynucleotide strands and provide reliable information for comparative work. The spacer sequence identifications that showed less than 99.0% similarity to those of reference strains were confirmed in all cases by sequencing the V2-V3 regions of their 16S rDNAs. Moreover, the spacer region method had the advantage of distinguishing between *L. rhamnosus* and *L. casei* strains, which cannot be accomplished by comparison of 16S V2-V3 region sequences. These species are commonly used in the production of probiotic products (14). As we have demonstrated here, amplification of the spacer regions by PCR can be carried out with suspensions of whole *Lactobacillus* cells, so colonies picked from agar plates can be used directly in identification of an isolate. DNA of a quality suitable for sequencing can be obtained within 48 h of culture of lactobacilli. For the majority of our *Lactobacillus* isolates, a clear species identification could be made on the basis of percent similarity to GenBank sequences (97.5 to 100.0% similarity). Even when 16S-23S sequences do not differ greatly between species (e.g., the *L. pentosus*/*L. plantarum* group), identification is at least aided by grouping of the isolate, as was the case with the silage strains. The use of 16S-23S spacer sequences in the identification of lactobacilli promises to be a valuable aid in advancing our knowledge of the species composition of *Lactobacillus* populations.

S. Rodtong was supported by a Teaching and Research Observation Fellowship from the Ministry of University Affairs, Thailand. Work conducted in Finland was aided by the Technology Development Centre of Finland, and A. Tilsala-Timisjarvi was the recipient of a grant from the Finnish Cultural Foundation.

The support of the University of Otago Research Committee is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. **215**:403–410.
2. **Amann, R. I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. **59**:143–169.
3. **Berthier, F., and S. D. Ehrlich.** 1998. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. FEMS Microbiol. Lett. **161**:97–106.
4. **Goldin, B. R., and S. L. Gorbach.** 1992. Probiotics for humans, p. 355–376. *In* R. Fuller (ed.), Probiotics. The scientific basis. Chapman and Hall, London, United Kingdom.
5. **Gurtler, V., and V. A. Stanisich.** 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. Microbiology **142**:3–16.
6. **Hammes, W. P., and R. F. Vogel.** 1995. The genus *Lactobacillus*, p. 19–54. *In* B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (ed.), The lactic acid bacteria, vol. 2. The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom.
7. **Holdeman, L. V., E. P. Cato, and W. E. C. Moore.** 1973. Anaerobe laboratory manual. VPI Anaerobe Laboratory, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
8. **Kandler, O., and N. Weiss.** 1986. Regular, nonsporing gram-positive rods, p. 1208–1234. *In* P. H. A. Sneath (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, Md.
9. **Mitsuoka, T.** 1992. The human gastrointestinal tract, p. 69–114. *In* B. J. B. Wood (ed.), The lactic acid bacteria, vol. 1. The lactic acid bacteria in health and disease. Elsevier Applied Science, London, United Kingdom.
10. **Nakagawa, T., M. Shimada, H. Mukai, K. Asada, I. Kato, K. Fujino, and T. Sato.** 1994. Detection of alcohol-tolerant hiochi bacteria by PCR. Appl. Environ. Microbiol. **60**:637–640.
11. **Nour, M.** 1998. 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of lactobacilli: nucleotide sequence, secondary structure and comparative analysis. Res. Microbiol. **149**:433–448.
12. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with

chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463–5467.
13. **Stackebrandt, E., and B. M. Goebel.** 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:846–849.
14. **Tannock, G. W.** 1998. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. Int. Dairy J. 8:527–533.
15. **Tilsala-Timisjarvi, A., and T. Alatossava.** 1997. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. Int. J. Food Microbiol. 35:49–56.
16. **Turner, S. J., G. D. Lewis, D. J. Saul, C. S. Baker, and A. G. Rodrigo.** 1998. Heteroduplex analysis: a simple method for characterising microbial community structure. Poster paper presented at the New Zealand Microbiological Society Annual Meeting, Masterton, New Zealand, 30 November to 3 December 1998.
17. **Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. De Vos, K. Kersters, and J. Swings.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev. 60:407–438.
18. **Weisburg, W. G., J. G. Tully, D. L. Rose, J. P. Petzel, H. Oyaizu, D. Yang, L. Mandelco, J. Sechrest, T. G. Lawrence, J. Van Etten, J. Maniloff, and C. R. Woese.** 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. J. Bacteriol. 171:6455–6467.