

การใช้ *Bacillus licheniformis* ที่คัดแยกได้จากกระเพาะรูเมนเพื่อเพิ่มการย่อยได้ของอาหารสูตรรวมในระบบ *in vitro*

Using *Bacillus licheniformis* isolated from rumen to enhance TMR feed digestibility in *in vitro* digestion

ชัยชนะ ตรีทิตยัณิภา¹, วิโรจน์ ภัทรจินดา^{1*}, มนต์ชัย ดวงจินดา¹, ยุพิน ผาสุก¹, งามนิธ นนท์โส²
 Chaichana Treetidnipa, Virote Pattarajinda^{1*}, Monchai Duangjinda¹, Yupin Phasuk¹ and Ngarmnit Nontaso²

บทคัดย่อ : การเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยได้ของอาหารเยื่อใยในสัตว์สามารถทำได้หลายวิธี การใช้จุลินทรีย์เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มการย่อยได้เยื่อใยในอาหารโค การศึกษาในครั้งนี้เพื่อใช้แบคทีเรียในการเพิ่มการย่อยได้ของอาหารสูตรรวม (TMR) ในหลอดทดลอง โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* จำนวน 8 ไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อที่ 10^7 CFU ml⁻¹ rumen fluid buffer และ อาหาร TMR สองสูตรคือ สูตรที่มีฟางข้าว และสูตรที่มีหญ้าที่แห้งเป็นแหล่งอาหารหลัก ซึ่งประกอบด้วย โปรตีนหยาบ 14 เปอร์เซ็นต์ และ TDN 64 เปอร์เซ็นต์ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD พบว่าการย่อยได้ของอาหารสูตรรวมฟางข้าวที่ใช้ *Bacillus licheniformis* ไอโซเลตที่ KKUR10, KKUR9 และ KKUR5 ทำให้การย่อยได้สูงที่สุดคือ 68.7, 67.3 และ 66.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ($p < 0.01$) การใช้ไอโซเลตที่ KKUR5, KKUR15 และ KKUR16 ทำให้การย่อยได้เยื่อใย NDF สูงสุดคือ 37.6, 37.6 และ 35.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ($p < 0.01$) และ การใช้ไอโซเลตที่ KKUR9, KKUR5 และ KKUR15 ทำให้การย่อยได้เยื่อใย ADF สูงสุดคือ 42.3, 40.0 และ 40.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ($p < 0.01$) ในส่วนอาหารสูตรรวมหญ้าที่แห้งพบว่า การใช้ *Bacillus licheniformis* ไอโซเลตที่ KKUR4, KKUR9 และ KKUR16 จะทำให้การย่อยได้สูงที่สุดคือ 72.5, 70.0 และ 68.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ($p < 0.01$) และ การใช้ไอโซเลตที่ KKUR4 และ KKUR16 มีค่าเฉลี่ยการย่อยได้เยื่อใย ADF สูงสุดคือ 58.9 และ 58.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ($p < 0.05$) แต่การย่อยได้เยื่อใย NDF ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ฉะนั้นการใช้ *Bacillus licheniformis* ที่คัดแยกได้สามารถเพิ่มการย่อยได้ของสิ่งแห้ง เยื่อใย NDF และ เยื่อใย ADF ในอาหาร TMR ให้สูงขึ้น โดยไอโซเลตที่ KKUR9 และ KKUR15 จะเป็นไอโซเลตที่เหมาะสมกับการใช้ในอาหาร TMR ทั้งสองชนิด จากวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า *Bacillus licheniformis* มีศักยภาพในการนำไปใช้ในการเพิ่มการย่อยได้ของอาหารสัตว์

คำสำคัญ : การย่อยได้ในหลอดทดลอง, *Bacillus licheniformis*, อาหารสูตรรวม

Abstract: Improving efficiency of fiber digestion in low quality roughage could be done by several methods and a selective microorganism is one of alternative methods. The objective of this study was to use *Bacillus licheniformis* isolated from ruminal fluid for improve feed digestion by using *in vitro* Daisy II Incubator. TMR rations had 14 % of crude protein and 64% of total digestible nutrients in both rice straw base and ruzi hay base rations. The bacterial concentration as use as 10^7 CFU ml⁻¹ rumen fluid buffer in both rice straw and ruzi hay base rations. Experiments were randomly assigned into CRD. In rice straw base ration, *Bacillus licheniformis* isolated numbers; KKUR10, KKUR9 and KKUR5 had the highest in feed dry matter digestibility (68.7, 67.3 and 66.0 %, respectively). Isolated numbers KKUR5, KKUR15 and KKUR16 had the highest in NDF digestion (37.6, 37.6 and 35.0 %, respectively). However, isolated numbers; KKUR9, KKUR5 and KKUR15 had the highest in ADF digestion (42.3, 40.0 and 40.0%, respectively). In ruzi hay base ration, *Bacillus licheniformis* isolated

¹ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*Corresponding author: virote@kku.ac.th

numbers; KKUR4, KKUR9 and KKUR16 had the highest in feed dry matter digestibility (72.5, 70.0 and 68.0 %, respectively). Isolated numbers; KKUR4 and KKUR16 had the highest in ADF digestion (58.9 and 58.7 %). However, there was no significant difference in NDF digestion among treatments. The final result indicated that *Bacillus licheniformis* isolated number KKUR9, and KKUR15 were suitable for all conduct rations. Research study showed that *Bacillus licheniformis* has a potential for use as feed additive in ruminant feed to improve feed digestibility.

Keywords : *in vitro* digestibility, *Bacillus licheniformis*, TMR

บทนำ

การเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยได้ของอาหารเยื่อใยในสัตว์สามารถทำได้หลายวิธี การใช้จุลินทรีย์เป็นอีกเทคนิคหนึ่งนอกเหนือจากการปรับปรุงพันธุกรรมโค จึงมีการนำจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ มาใช้เพื่อช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการย่อยได้ของโค การใช้จุลินทรีย์เสริมโดยตรง (direct feed microbial, DFM) นั้นเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไป โดยมีผลต่อการเพิ่มการย่อยได้ในกระเพาะรูเมน, DMI, และ ผลผลิตน้ำนม (Piva et al., 1993; McGilliard and Stallings, 1998) เพิ่มการย่อยได้สิ่งแห้ง การย่อยได้เยื่อใย NDF (Weinberg et al, 2007) ในการใช้จุลินทรีย์เป็นอาหารเสริมนั้น สามารถผสมลงไปในอาหาร เช่นการใช้ *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp., *Enterococcus* sp. และ *Bacillus* sp. (Qiao et al, 2009) โดยมีวัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือมุ่งเน้นการใช้ *B. licheniformis* ในการเพิ่มการย่อยได้ของอาหารสูตรรวมในระบบ *in vitro*

วิธีการทดลอง

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยเซลลูโลส ซึ่งคัดเลือกได้จากกระเพาะรูเมนโคนมลูกผสมสายพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียนในระยะพักโรค โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Med2 (Hobson and Stewart, 1997) ด้วยวิธี anaerobic roll tube method จำนวน 8 ไชโซเลต ประกอบด้วย *Bacillus licheniformis* KKUR4, KKUR5, KKUR9, KKUR10, KKUR15, KKUR16, KKUR19 และ KKUR20 (ชัยชนะ และ คณะ, 2553)

การศึกษาการย่อยได้ในระบบ *in vitro* digestibility เครื่อง Daisy II Incubator (Ankom Technology, Fairport, NY) ใช้แผนการทดลองแบบ CRD ประกอบด้วยแบคทีเรียจำนวน 8 ไชโซเลต โดยมีความเข้มข้นของเชื้อที่เติมเข้าไปคือ 10^7 CFU ml⁻¹ rumen fluid buffer โดยใช้ของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคนมลูกผสมสายพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียนในระยะพักโรคในการเตรียม rumen fluid buffer นำมาทดสอบกับอาหารสูตรรวม (TMR) 2 สูตร โดยสูตรที่ 1 ใช้ฟางข้าว และสูตรที่ 2 ใช้หญ้าหูกแห้งเป็นแหล่งอาหารหลัก ซึ่งมีโปรตีน 14% และ TDN 67% เท่ากันทุกสูตรโดยโปรแกรม KCF 2006 (วิโรจน์ และ มนต์ชัย, 2549) (Table 1 and 2) และคำนวณการย่อยได้ตามสูตรดังนี้

การย่อยได้สิ่งแห้งรวม, IVDMD (*in vitro* dry matter digestibility) =

$$\frac{100 - (W_3 - (W_1 \times C_1))}{W_2} \times 100$$

การย่อยได้เยื่อใย NDF, IVNDF (*in vitro* NDF digestibility) (Cherney et al., 2004)

$$= 100 - \left[\left(\frac{\text{NDF ที่เหลือจากการบ่ม 48 ชั่วโมง}}{\text{NDF ก่อนการบ่ม}} \right) \times 100 \right]$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักถุงเปล่า, W_2 = น้ำหนักอาหารสุทธิ (น้ำหนักแห้ง), W_3 = น้ำหนักถุงสุดท้าย

หลังจากบ่ม 48 ชั่วโมงและอบแห้ง, C_1 = Blank bag correction (น้ำหนักถุงเปล่าอบแห้งหลังการบ่ม 48 ชั่วโมงหารด้วยน้ำหนักถุงเปล่าเริ่มต้นวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of variance, ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ CRD และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยการย่อยได้ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (SAS, 1988)

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

ผลของการย่อยของอาหารสูตรรวมที่มีฟางเป็นแหล่งอาหารหยาบหลัก

จากการใช้ *Bacillus licheniformis* ทั้ง 8 ไส้หลอด เมื่อผ่านการบ่มนาน 48 ชั่วโมง พบว่า ค่าเฉลี่ยของการย่อยได้ของวัตถุดิบแห้ง การย่อยได้เยื่อใย NDF และเยื่อใย ADF มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) โดยไส้หลอดที่ KKUR10, KKUR9 และ KKUR5 มีค่าเฉลี่ยการย่อยได้สิ่งแห้งสูงสุดคือ 68.75, 67.30 และ 66.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

อีกทั้งค่าเฉลี่ยการย่อยได้ของเยื่อใย NDF โดยไส้หลอดที่ KKUR5, KKUR15, KKUR20 และ KKUR16 มีค่าเฉลี่ยการย่อยได้เยื่อใย NDF สูงสุดคือ 37.60, 37.60, 37.60 และ 35.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และค่าเฉลี่ยของการย่อยได้ของเยื่อใย ADF โดยไส้หลอดที่ KKUR9, KKUR5 และ KKUR15 มีค่าเฉลี่ยการย่อยได้เยื่อใย ADF สูงสุดคือ 42.31, 40.00 และ 40.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีค่าเฉลี่ย

การย่อยได้ที่ระดับ 21.54 เปอร์เซ็นต์ (Table 3)

ผลของการย่อยของอาหารสูตรรวมที่มีหญ้ารูซี่แห้งเป็นแหล่งอาหารหยาบหลัก

เมื่อผ่านการบ่มนาน 48 ชั่วโมง พบว่า ค่าเฉลี่ยของการย่อยได้ของวัตถุดิบแห้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) โดยไส้หลอดที่ KKUR4, KKUR9 และ KKUR16 มีค่าเฉลี่ยการย่อยได้สิ่งแห้งสูงสุดคือ 72.54, 70.00 และ 68.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และค่าเฉลี่ยการย่อยได้ของเยื่อใย ADF มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยไส้หลอดที่ KKUR4 และ KKUR16 มีค่าเฉลี่ยการย่อยได้สิ่งแห้งสูงสุดคือ 58.97 และ 58.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่พบว่าค่าเฉลี่ยของการย่อยได้ของเยื่อใย NDF ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยไส้หลอดที่ KKUR15 และ KKUR4 มีค่าเฉลี่ยการย่อยได้สิ่งแห้งสูงสุดคือ 46.15 และ 41.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีค่าเฉลี่ยการย่อยได้ที่ระดับ 33.75 เปอร์เซ็นต์ (Table 4)

Table 1 Feed ingredient of experimental TMR diets on DM basis.

วัตถุดิบ	ฟางข้าว	หญ้ารูซี่แห้ง
หญ้ารูซี่แห้ง	-	55.0
ฟางข้าว	55.0	-
เมล็ดข้าวโพด	19.4	2.3
มันสำปะหลัง	5.0	28.6
กากถั่วเหลือง	19.5	12.9
ยูเรีย	0.9	1.0
แร่ธาตุรวม	0.2	0.2
รวม	100.0	100.0

Table 2 Feed chemical composition in TMR diets on DM basis.

องค์ประกอบทางเคมี (%)	ฟางข้าว	หญ้ารูซี่แห้ง
CP	14.0	14.0
ADF	24.8	19.3
NDF	42.6	28.1
TDN	67.0	67.0
fat	1.6	1.2

Table 3 ผลของ *Bacillus licheniformis* ต่อการย่อยได้สิ่งแห้งและเยื่อใย NDF, ADF ในอาหารสูตรรวมที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งเยื่อใยหลักในระบบ *in vitro*.

Item	<i>Bacillus licheniformis</i> ¹									SEM	P-value
	control	KKUR4	KKUR5	KKUR9	KKUR10	KKUR15	KKUR16	KKUR19	KKUR20		
IVDMD ² , %	52.92 ^d	64.69 ^{ab}	66.00 ^a	67.30 ^a	68.75 ^a	60.00 ^{bc}	64.58 ^{abc}	59.60 ^c	64.00 ^{abc}	0.69	0.0008
IVNDFD ³ , %	28.60 ^b	28.60 ^b	37.60 ^a	30.00 ^b	24.16 ^c	37.60 ^a	35.00 ^a	22.51 ^c	37.60 ^a	0.40	0.0001
IVADFD ⁴ , %	21.54 ^c	21.54 ^c	40.00 ^a	42.31 ^a	27.08 ^{bc}	40.00 ^a	16.67 ^c	36.14 ^{ab}	20.00 ^c	1.68	0.0027

^{a,b,c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงค่าเฉลี่ยแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.01$)

¹ ชนิดของ *Bacillus licheniformis* แต่ละไอโซเลต, ความเข้มข้นสุดท้าย 10^7 CFU ml⁻¹ rumen fluid buffer

² IVDMD = ค่าเฉลี่ยของการย่อยได้สิ่งแห้งในระบบ *in vitro*

³ IVNDFD = ค่าเฉลี่ยของการย่อยได้เยื่อใย NDF ในระบบ *in vitro*

⁴ IVADFD = ค่าเฉลี่ยของการย่อยได้เยื่อใย ADF ในระบบ *in vitro*

Table 4 ผลของ *Bacillus licheniformis* ต่อการย่อยได้สิ่งแห้งและเยื่อใย NDF ,ADF ในอาหารสูตรรวมที่มีหญ้าข้าวสาลีแห้งเป็นแหล่งเยื่อใยหลักในระบบ *in vitro*.

	<i>Bacillus licheniformis</i> ¹									SEM	P-value
	control	KKUR4	KKUR5	KKUR9	KKUR10	KKUR15	KKUR16	KKUR19	KKUR20		
IVDMD ² , %	61.16 ^{de}	72.54 ^a	63.25 ^{cde}	70.00 ^{ab}	64.00 ^{cd}	66.69 ^{bc}	68.02 ^{abc}	58.47 ^e	65.25 ^{bcd}	1.66	0.0033
IVNDFD ³ , %	33.75	41.15	33.54	30.00	40.00	46.15	40.34	38.75	38.75	1.52	0.1235
IVADFD ⁴ , %	31.94 ^c	58.97 ^a	48.96 ^{ab}	50.00 ^{ab}	41.66 ^{bc}	50.96 ^{ab}	58.74 ^a	52.81 ^{ab}	48.96 ^{ab}	2.03	0.0326

^{a,b,c,d,e} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกัน แสดงค่าเฉลี่ยแตกต่างกันทางสถิติ (IVDMD ที่ $p < 0.01$ และ IVADFD ที่ $p < 0.05$)

¹ ชนิดของ *Bacillus licheniformis* แต่ละไอโซเลต, ความเข้มข้นสุดท้าย 10^7 CFU ml⁻¹ rumen fluid buffer

² IVDMD = ค่าเฉลี่ยของการย่อยได้สิ่งแห้งในระบบ *in vitro*

³ IVNDFD = ค่าเฉลี่ยของการย่อยได้เยื่อใย NDF ในระบบ *in vitro*

⁴ IVADFD = ค่าเฉลี่ยของการย่อยได้เยื่อใย ADF ในระบบ *in vitro*

สรุป

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้ *Bacillus licheniformis* ที่ระดับ 10^7 CFU ml⁻¹ rumen fluid buffer สามารถเพิ่มการย่อยได้สิ่งแห้ง การย่อยได้เยื่อใย NDF และการย่อยได้เยื่อใย ADF เพิ่มสูงขึ้นในอาหาร TMR ที่มีฟางเป็นแหล่งอาหารหยาบหลัก และเพิ่มการย่อยได้สิ่งแห้ง และ เยื่อใย ADF ในอาหาร TMR ที่มีหญ้าข้าวสาลีแห้งเป็นแหล่งอาหารหยาบหลักได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เชื้อ *B. licheniformis* ที่คัดเลือกได้มีความสามารถในการเพิ่มการย่อยได้ให้สูงขึ้นอย่างชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งไอโซเลตที่ KKUR9 และ KKUR15 เป็นไอโซเลตที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในการเพิ่มการย่อยได้ในอาหารสูตรรวมทั้งสองชนิด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในการผลิตปศุสัตว์ต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการและศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรเกษตร และ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถานีทดลองและฝึกอบรมเกษตรกรรม จังหวัดร้อยเอ็ด คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- วิโรจน์ ภัทรจินดา และมนต์ชัย ดวงจินดา. 2549. KCF 2006 โปรแกรมจัดการอาหารโคนมและคำนวณสูตรอาหารต่ำสุด. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- ชัยชนะ ศรีทิตยนิภา วิโรจน์ ภัทรจินดา มนต์ชัย ดวงจินดา ยุพิน ผาสุข และงามนิจ นนทโส. 2553. การคัดเลือกแบคทีเรีย ย่อยเซลลูโลสเพื่อเพิ่มการใช้ประโยชน์จากแหล่งอาหาร หยาดและบ่งชี้อาหารด้วยเทคนิคอณูพันธุศาสตร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- Cherney, D. J. R., J. H. Cherney, and L. E. Chase. 2004. Lactation performance of Holstein cow fed fescue, orchardgrass, or alfalfa silage. J. Dairy Sci. 87:2268-2276.
- Hobson, P. N., and C. S. Stewart. 1997. The Rumen Microbial Ecosystem. 2nded. Blackie Academic & Professional, NY.
- McGilliard, M. L., and C. C. Stallings. 1998. Increase milk yield of commercial dairy herds fed a microbial and enzyme supplement. J. Dairy Sci. 81:1353-1357.
- Piva, G. S., S. Belladonna, G. Fusconi, and F. Sicbaldi. 1993. Effects of yeast on dairy cow performance, ruminal fermentation, blood components, and milk manufacturing properties. J. Dairy Sci. 76:2717-2722.
- Qiao, G. H., A. S. Shan, N. Ma, Q. Q. Ma and Z. W. Sun. 2009. Effect of supplemental *Bacillus* cultures on rumen fermentation and milk yield in Chinese Holstein cows. Available: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/122528734/PDFSTART>. Accessed Nov. 10, 2009.
- SAS. 1988. SAS[®] User's Guide: Statistics, Version 6 Edition. SAS inst., Inc., Cary, NC.
- Weinberg, Z. G., O. Shatz, Y. Chen, E. Yosef, M. Nikbahat, D. Ben-Ghedalia, and J. Miron. 2007. Effect of lactic acid bacteria inoculants on *in vitro* digestibility of wheat and corn silages. J Dairy Sci. 90: 4754-4762.