ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การผลิตสัตว์)

ปริญญา

การผลิตสัตว์ สัตวบาล

สาขา **ภาควิชา**

เรื่อง การผลิตโปรไบโอติก: การคัดเลือกแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่มีศักยภาพสูงจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

Probiotic Production: Selection of High Potential Fibrolytic Bacteria from Swamp Buffalo Rumen

นามผู้วิจัย นายภูมพงศ์ บุญแสน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุริยะ สะวานนท์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(พริมา พิริยางกูร, ปร.ด.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสกสม อาตมางกูร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ **เดือน** **พ.ศ.**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตโปรไบโอติก: การคัดเลือกแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่มีศักยภาพสูง จากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

Probiotic Production: Selection of High Potential Fibrolytic Bacteria from Swamp Buffalo Rumen

โดย

นายภูมพงศ์ บุญแสน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การผลิตสัตว์)
พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภูมพงศ์ บุญแสน 2553: การผลิตโปรไบโอติก: การคัดเลือกแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่มีศักยภาพสูงจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การผลิตสัตว์) สาขาการผลิตสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุริยะ สะวานนท์, Ph.D. 125 หน้า

การศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายเยื่อใยของอาหารหยาบจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก การทดลองที่ 1 เป็นการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยจากกระบือปลักที่ได้รับอาหารหยาบ (ฟางข้าวหรือหญ้าขนสด) โดยใช้กระบือปลักโตเต็มวัย เพศเมีย จำนวน 4 ตัว ที่เจาะกระเพาะรูเมน โดยนำแบคทีเรียที่ยึดเกาะบนอาหารหยาบมาย่อยกระดาษกรองและแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการ Roll tube จากนั้นคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่ย่อยกระดาษกรองได้ มาย้อมติดสีแกรม แล้วศึกษาความสามารถย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าว (RS) รวมทั้งวิเคราะห์กรดไขมันที่ระเหยง่ายและบ่งชี้อเชื้อแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยด้วยวิธีแบบดั้งเดิมและวิธีการด้านชีวโมเลกุล พบว่าแบคทีเรียที่ย่อยกระดาษกรองทั้งหมดเซลล์ย้อมติดสีแกรมลบรูปร่างกลม และคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวได้ดี จำนวน 30 สายพันธุ์ ผลจากการวิเคราะห์กรดไขมันที่ระเหยง่าย พบว่าส่วนใหญ่ผลิต อะซิเตท (C_2) และบิวทิเรท (C_4) บางสายพันธุ์มีการผลิตวาเลอเรท (C_5) เล็กน้อย แบคทีเรียทั้ง 30 สายพันธุ์ มีลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรีย 26 สายพันธุ์ มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย 7 ชนิด คือ *Butyrivibrio fibrisolvens* (5), *Clostridium* sp. (5), *Fibrobacter succinogenes* (3), *Prevotella* sp. (4), *Streptococcus* sp. (7), *Staphylococcus* sp. (1) และ *Selenomonas ruminantium* (1) และแบคทีเรียที่ยังไม่ทราบชนิดอีก 4 สายพันธุ์

การทดลองที่ 2 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่คัดเลือกมาได้ในหลอดทดลอง (*In vitro* study) โดยนำแบคทีเรียบริสุทธิ์จากการทดลองที่ 1 จำนวน 30 สายพันธุ์ มาวัดความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของ ฟางข้าว หญ้าขน และเซลลูโลสบริสุทธิ์ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใย (Cellulase และ Xylanase) และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูง 5 สายพันธุ์ มาศึกษาความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใยทั้งสามชนิดและความสามารถในการผลิตแก๊ส พบแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ ที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าว หญ้าขน และเซลลูโลสบริสุทธิ์ ประกอบด้วย *Prevotella* sp. RS1, *F. succinogenes* RS3, *F. succinogenes* RS4, *Staphylococcus* sp. RS12 และ *Clostridium* sp. PG85 โดยแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสสูง นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใยทั้งสามชนิดที่สูงด้วย

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Phoompong Boonsaen 2010: Probiotic Production: Selection of High Potential Fibrolytic Bacteria from Swamp Buffalo Rumen. Master of Science (Animal Production), Major Field: Animal Production, Department of Animal Science. Thesis Advisor: Assistant Professor Suriya Sawanon, Ph.D. 125 pages.

Two consecutive experiments were carried out to isolate the high potential fibrolytic bacteria from swamp buffalo rumen. Four mature, rumen fistulated buffalos were fed either low quality roughage (Rice Straw; RS) or fresh grass (Paragrass; PG). Roughage suspended in buffalo rumen was used as the isolated source. The source was enriched with filter paper degradation, diluted with an anaerobic solution and used for pure culturing by roll tube technique. Degradated filter paper bacteria were collected and gram staining, and then, used for digestibility studies on rice straw fiber powder, VFA profiling and 16S rDNA sequencing were selected and screened for further identification. All of staining bacteria were gram-negative cocci. Thirty strains of best rice straw digestibility were found. Majority of isolated bacteria produced acetate and butyrate some produced valerate. Twenty-six strains were identified, as 7 known bacterial species which were *Butyrivibrio fibrisolvens* (5), *Clostridium* sp. (5), *Fibrobacter succinogenes* (3), *Prevotella* sp. (4), *Streptococcus* sp. (7), *Staphylococcus* sp. (1) and *Selenomonas ruminantium* (1), whilst 4 strains were assigned to unidentified bacterial species.

The second trail was aimed at study (*In vitro* study) on 30 strains fibrolytic bacteria isolated from the first experiment, which selected for high potential fibrolytic enzymes (cellulase and xylanase) and then 5 strains of the high potential fibrolytic bacteria were collected to study, attachment, digestion of various fiber powder (i.e. Rice Straw; RS, Paragrass; PG and Cellulose powder; CP) and total gas production. High potential fibrolytic bacteria consisted of 5 strain consisting of *Prevotella* sp. RS1, *F. succinogenes* RS3, *F. succinogenes* RS4, *Staphylococcus* sp. RS12 and *Clostridium bifermentans* PG85. These high potential fibrolytic bacteria had high activities of cellulase and xylanase. Furthermore, these 5 strains were shown a high percentage of adherents on three different fiber powders.

/ /

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ได้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุริยะ สะวานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทั้งทางด้านการศึกษา การวางแผนงานวิจัยและเงินทุน ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำ การทดลอง ตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ ดร.พริมา พิริยางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิและประธาณการสอบ ตลอดจนคณาอาจารย์ทุกท่านที่ให้คำปรึกษา แนะนำ และช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณคณาอาจารย์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ห้องปฏิบัติการสรีระวิทยา ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน และศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตกระบือและโค ทุกท่านที่ให้การสนับสนุนสถานที่และสัตว์ทดลอง ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ผลการทดลองต่างๆ และคณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และขอขอบคุณพี่น้องและเพื่อนๆ นิสิตภาควิชาสัตวบาลมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจและให้การช่วยเหลือการวิจัยครั้งนี้จนเสร็จสมบรูณ์ด้วยดี

ข้าพเจ้าขอมอบความดีแห่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้แก่ นายวิทยา บุญแสน บิดาผู้ล่วงลับ และนางเจริญศรี บุญแสน มารดาผู้ซึ่งให้กำเนิดและอุปถัมภ์อุ้มชูจนข้าพเจ้าได้มีวันนี้ คอยผลักดันให้ความรัก กำลังใจ และโอกาสในการศึกษามาโดยตลอด จนได้รับความสำเร็จในปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต และข้าพเจ้าขอขอบพระคุณบูรพาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาและให้การอบรมสั่งสอนตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

นายภูมพงศ์ บุญแสน

มีนาคม 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	26
อุปกรณ์	26
วิธีการ	35
ผลและวิจารณ์	45
สรุปและข้อเสนอแนะ	75
สรุป	75
ข้อเสนอแนะ	76
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	77
ภาคผนวก	89
ภาคผนวก ก สรุปขั้นตอนการทดลอง	90
ภาคผนวก ข ลำดับเบสของ 16S rDNA	105
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	125

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบและความสามารถในการย่อยได้ของส่วนต่างๆ ของข้าวเจ้า ข้าวบาร์เลย์ และข้าวสาลี	8
2	จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ได้รับฟางข้าวและหญ้าขนสด	46
3	ลักษณะรูปร่างของเซลล์ การย้อมติดสีแกรม และความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ได้รับฟางข้าวและหญ้าขนสด	48
4	จำนวนของแบคมีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวในหลอดทดลอง ที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ได้รับฟางข้าวและหญ้าขนสด หลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	49
5	ผลผลิตกรดไขมันที่ระเหยง่ายของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอน	50
6	การจำแนกความเหมือนของลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่อยู่ในธนาคารยีน (GenBank)	52
7	ความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของ ฟางข้าว หญ้าขนสด และผงเซลลูโลส ในหลอดทดลอง ของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก หลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	69
8	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส ของภายในเซลล์ของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอน	72
9	ความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใยของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่มีศักภาพสูงที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก	74
10	ผลผลิตแก๊สของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่มีศักภาพสูงที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลลูโลสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	74

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส	4
2	โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส	5
3	โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน	6
4	โครงสร้างทางเคมีของซิลิกาที่อยู่ในฟางข้าว	7
5	กระบวนการย่อยสลายเยื่อใยของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน	19
6	ขั้นตอนการปลูกถ่ายเชื้อลงในอาหารวุ้นโดยใช้วิธีการ Roll tube	36
7	กระดาษกรองที่ถูกย่อย (A) กระดาษกรองที่ไม่ถูกย่อย (B)	36
8	การแยกชิ้นส่วน 16S rDNA โดยวิธี Gel electrophoresis (~900 bp)	40
9	การตรวจสอบหาดีเอ็นเอเป้าหมายในดีเอ็นลูกผสม	51
10	แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของ 16S rDNA ของ *Butyrivibrio* sp. กับแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก	54
11	แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของ 16S rDNA ของ *Clostridium* spp. กับแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก	56
12	แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของ 16S rDNA ของ *F. succinogenes* กับแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก	58
13	แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของ 16S rDNA ของ *Prevotella* spp. กับแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก	60
14	แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของ 16S rDNA ของ *Streptococcus* spp. กับแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก	62
15	แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของ 16S rDNA ของ *Staphylococcus* spp. กับแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก	64

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

16 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของ 16S rDNA ของ *S. ruminatium* กับแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก 66

ภาพผนวกที่

1 Restriction map of vector pTZ57R/T (Fermentas) 105

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การผลิตโปรไบโอติก: การคัดเลือกแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่มีศักยภาพสูง จากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

Probiotic Production: Selection of High Potential Fibrolytic Bacteria from Swamp Buffalo Rumen

คำนำ

สัตว์เคี้ยวเอื้องเป็นสัตว์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนอาหารไปเป็นผลผลิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารหยาบไปเป็นแหล่งโปรตีนคุณภาพสูง ทั้งเนื้อ นม และขน ความสามารถดังกล่าวเกิดจากการทำงานของจุลินทรีย์ ได้แก่ โปรโตซัว เชื้อรา และแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียซึ่งเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีประชากรสูงสุดและมีความสำคัญที่สุดในการย่อยสลายโภชนะในกระเพาะรูเมน (Hespell *et al.,* 1997) ในขณะที่อาหารหยาบของสัตว์เคี้ยวเอื้องมีความหลากหลายของชนิดขึ้นกับสภาพภูมิประเทศ และภูมิอากาศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยซึ่งมีความผันแปรของพืชอาหารหยาบค่อนข้างมาก กล่าวคือ ในช่วงของฤดูฝนที่มีอาหารหยาบคุณภาพดีค่อนข้างสั้น ในขณะที่มีช่วงของฤดูแล้งที่ยาวนาน

ในช่วงฤดูแล้งนี้เป็นช่วงที่พืชอาหารสัตว์คุณภาพดีขาดแคลน เกษตรกรมีความจำเป็นต้องใช้วัสดุเศษเหลือจากไร่นา เช่น ฟางข้าว ซึ่งมีมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ของวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรทั้งหมด คิดเป็นปริมาณทั้งประเทศประมาณ 50 ล้านตันต่อปี (กรมพัฒนาที่ดิน, 2551) ฟางข้าวเป็นพืชอาหารหยาบที่มีคุณภาพต่ำ ทำให้สัตว์ได้รับสารอาหารและพลังงานไม่เพียงพอต่อความต้องการ อย่างไรก็ตาม สัตว์เคี้ยวเอื้องอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายเยื่อใย เนื่องจากจุลินทรีย์ย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องมีประสิทธิภาพในการหมักย่อยอาหารหยาบคุณภาพต่ำได้ดี และสามารถผลิตผลผลิตสุดท้าย เช่น กรดไขมันที่ระเหยง่ายและจุลินทรีย์โปรตีน เพื่อให้สัตว์ดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้ (สุริยะ, 2551)

กระบือเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการใช้ประโยชน์จากอาหารหยาบคุณภาพต่ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งฟางข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเปรียบเทียบกับโค (Ruangprim *et al.*, 2007; Sawar *et al.,* 1998; Wanapat *et al.,* 2000) แม้ว่าฟางข้าวมีองค์ประกอบของเซลลูโลส ลิกโนเซลลูโลส และซิลิกาอยู่สูงก็ตาม ซึ่งเป็นไปได้ว่าในกระเพาะรูเมนของกระบือมีจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายและมีศักยภาพในการย่อยสลายเยื่อใยสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย ดังนั้นถ้าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายเยื่อใยเหล่านี้ได้ โดยที่แบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงเหล่านี้อาจจะถูกพัฒนาไปใช้เป็นโปรไบโอติก (Probiotic) เสริมในอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดอื่น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายอาหารหยาบให้ดียิ่งขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายเยื่อใยของอาหารหยาบจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติและความสามารถของแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใย ความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใย และความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใย เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเป็นโปรไบโอติกที่จะใช้เสริมในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดอื่นต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

ฟางข้าว

ข้าว (*Oryza sativa*) เป็นธัญพืชที่เพาะปลูกมากเป็นอันดับสองของโลกรองจากข้าวสาลี และให้เศษเหลือในรูปของฟางข้าวสูงที่สุด (330 ล้านเมตริกตันต่อปี) ฟางหมายถึงลำต้นแห้งของธัญพืชหลังจากการเก็บเกี่ยว อาทิ ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต ข้าวเจ้า ข้าวเหนียว ข้าวไรย์ ข้าวสาลี เป็นต้น ประโยชน์ของฟางมีมากมายตั้งแต่ใช้เป็นอาหารสัตว์ วัสดุรองพื้นคอกสัตว์ วัสดุคลุมดิน ไปจนถึงพลังงานทดแทน ซึ่ง 90 เปอร์เซ็นต์ ของประเทศที่กำลังพัฒนาในเอเชียตะวันออกและตะวันออกเฉียงใต้ ใช้ฟางข้าวเป็นอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง (Van Soest, 2006) แต่อย่างไรก็ตามในประเทศไทยฟางส่วนใหญ่เป็นฟางข้าวเจ้า ซึ่งแต่ละปีมีฟางข้าวจากนาข้าวหลายล้านตัน ลักษณะของฟางข้าวจะประกอบด้วยส่วนของใบ ลำต้น และรวงข้าว ที่เอาเมล็ดออกแล้ว มีสีเหลืองซีด โดยฟางข้าวจะประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ (Cell content) 21 เปอร์เซ็นต์ และ ผนังเซลล์ (Cell wall) 79 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งส่วนของผนังเซลล์ประกอบด้วยส่วนที่เป็นเซลลูโลส 33 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 26 เปอร์เซ็นต์ ลิกนิน 7 เปอร์เซ็นต์ และซิลิกา 13 เปอร์เซ็นต์ (ปรีชาและทวีพร, 2551)

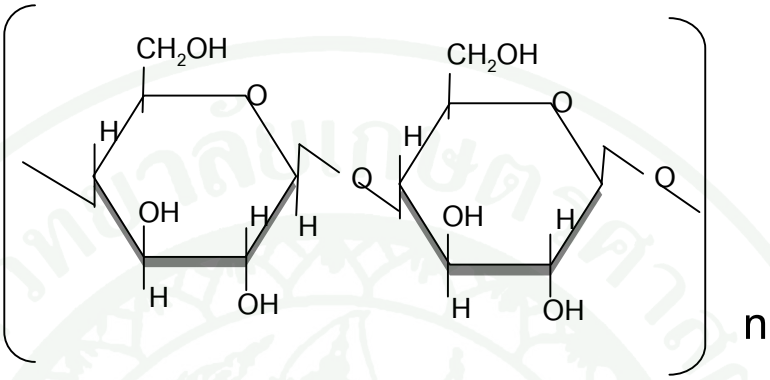
1. เซลลูโลส (Cellulose)

เซลลูโลสเป็นโพลิแซ็กคาไรด์ที่มีมากที่สุดในธรรมชาติ เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืชซึ่งถือว่าเป็นส่วนของเยื่อใย ทนต่อการย่อยด้วยกรดและด่าง ประกอบด้วยกลูโคสจำนวนมากเชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรงด้วยพันธะแบบ $\beta(1\rightarrow4)$ (ภาพที่ 1) ซึ่งพันธะนี้ไม่สามารถย่อยได้ด้วยเอนไซม์ของสัตว์ชั้นสูง แต่จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) ที่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ (บุญล้อม, 2546)

การย่อยเซลลูโลสในกระเพาะรูเมน ส่วนใหญ่เกิดจากการทำงานของแบคทีเรียในกลุ่มที่ย่อยเซลลูโลส (Cellulolytic bacteria) เป็นหลัก โดยแบคทีเรียจะหลั่งเอนไซม์เซลลูเลสออกมาย่อยโดยตรง เอนไซม์เซลลูเลสจะทำหน้าที่ในการตัดพันธะ β(1-4) กลูโคสแบบสุ่ม ทำให้ได้เซลลูโลสสายสั้นๆ (Cellodextrins หรือ Cello-oligosaccharide) จากนั้นเซลลูโลสสายสั้นๆ จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส (Cellobiohydrolase หรือ 1,4-β-D-glucan 4- cellobiohydrolase) ทำให้ได้เซลโลไบโอส (Cellobiose) และเซลโลไบโอสจะถูกย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลโลไบเอส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(Cellobiase หรือ β-glucosidases หรือ β-D-glucoside glucohydrolase) ทำให้ได้น้ำตาลกลูโคส (สุริยะ, 2551)



ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส

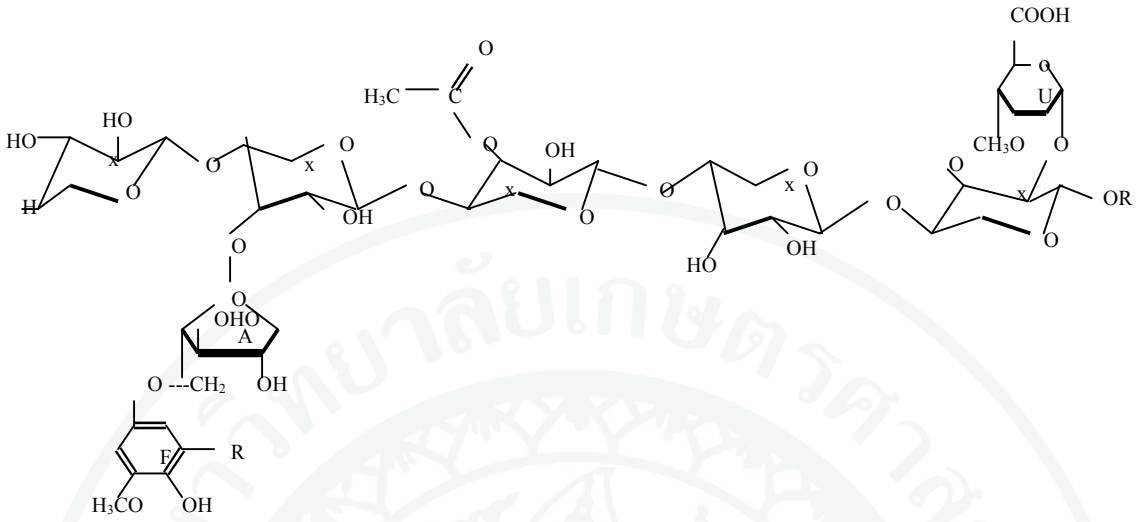
ที่มา: บุญล้อม (2546)

2. เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)

เฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืชเช่นกัน ซึ่งไม่สามารถย่อยได้ด้วยเอนไซม์ของสัตว์ แต่ย่อยได้โดยจุลินทรีย์เช่นเดียวกับเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสมีโครงสร้างคล้ายเซลลูโลส แต่เป็นเฮทเทอโรโพลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลมากกว่า 2 สองชนิด (ภาพที่ 2) โดยน้ำตาลที่พบมากคือ ไซโลส (D-xylose) และอะราบิโนส (Arabinose) ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม นอกจากนี้อาจมีกลูโคส (D-glucose) แมนโนส (D-mannose) กาแล็กโตส (D-galactose) และกรดกลูคูโรนิก (D-glucuronic acid) เชื่อมกันด้วยพันธะ β(1→4) และอาจมี side chain ด้วย

เฮมิเซลลูโลสอาจจำแนกตามชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบได้เป็น แมนแนน (Mannan) กาแล็กแทน (Galactan) ไซแลน (Xylan) กลูโคแมนแนน (Glucomannan) อะราบิโนไซ-แลน (Arabinoxylan) และอะราบิโนกาแล็กแทน (Arabinogalactan) เป็นต้น (บุญล้อม, 2546)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



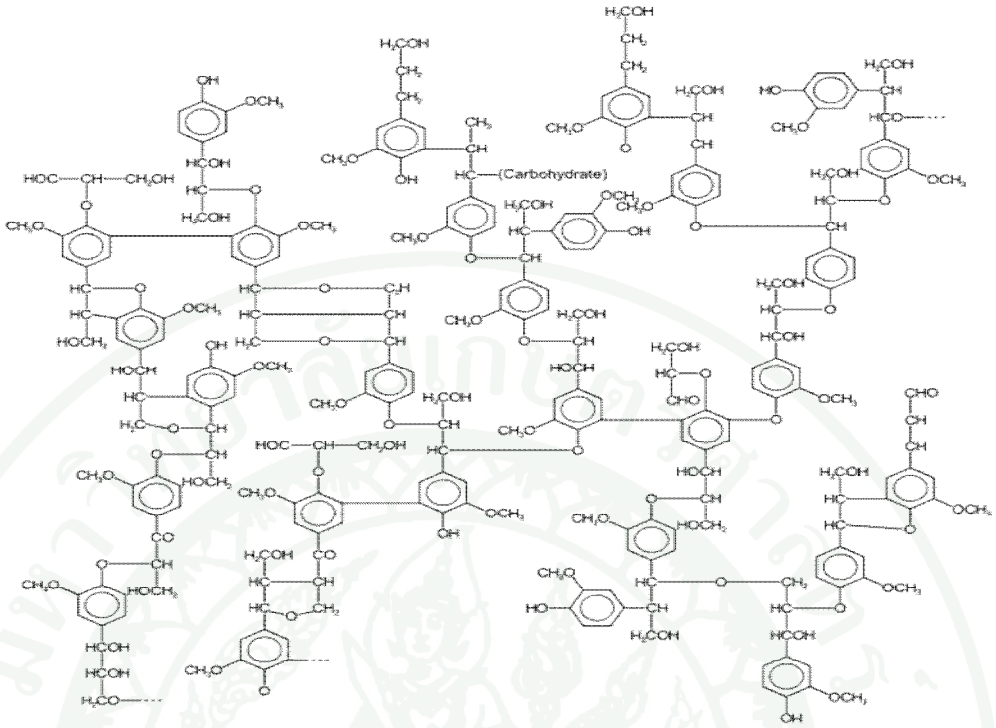
ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส

ที่มา: ดัดแปลงจาก สุริยะ (2551)

3. ลิกนิน (Lignin)

ลิกนินไม่จัดเป็นคาร์โบไฮเดรต แต่เป็นอนุพันธ์ของสารเฟนิลโพรเพน (Phenyl propane) เนื่องจากมักอยู่รวมกับเฮมิเซลลูโลสในผนังเซลล์ของพืช (ภาพที่ 3) และในการวิเคราะห์อาหารแบบพรอกซิเมท (Proximate analysis) พบลิกนินประมาณ 3.20-6.64 เปอร์เซ็นต์ อยู่รวมในส่วนของเยื่อใยรวม (Crude fiber; CF) จึงมักถูกเอ่ยถึงพร้อมกับคาร์โบไฮเดรตประเภทโครงสร้าง และเรียกรวมเป็น ลิกโนเซลลูโลส (Ligno-cellulose) ซึ่งลิกโนเซลลูโลสมีอยู่สูงประมาณ 34-59 เปอร์เซ็นต์ (ปรีชาและทวีพร, 2551) ลิกนินช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับต้นและใบพืช พืชยิ่งอายุมากขึ้นก็ยิ่งมีลิกนินมากขึ้น ทำให้ย่อยได้ยาก เพราะเอนไซม์จากสัตว์ไม่สามารถย่อยลิกนินได้ นอกจากนี้ยังขัดขวางไม่ให้เอนไซม์เข้าไปย่อยโภชนะอื่นที่อยู่ภายในเซลล์พืชด้วย ในพืชอ่อนและเมล็ดมีลิกนินต่ำ ทำให้สัตว์กระเพาะเดี่ยวสามารถใช้ประโยชน์ได้ดี (บุญล้อม, 2546) ลิกนินมีความสัมพันธ์กับ Phenolic acids ซึ่งทำให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน ซึ่งหากมีการจับกันเป็นสายยาว (Polyphenol) อาจทำให้ลดความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใยของแบคทีเรีย หรือยับยั้ง Enzyme complexes ที่ปล่อยออกมาย่อยสลายเยื่อใยในบริเวณนั้นได้ (Doyle *et al.*, 1986; Jung *et al.*, 1993)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน

ที่มา: The free encyclopedia (2009a)

4. ซิลิกา (Silica)

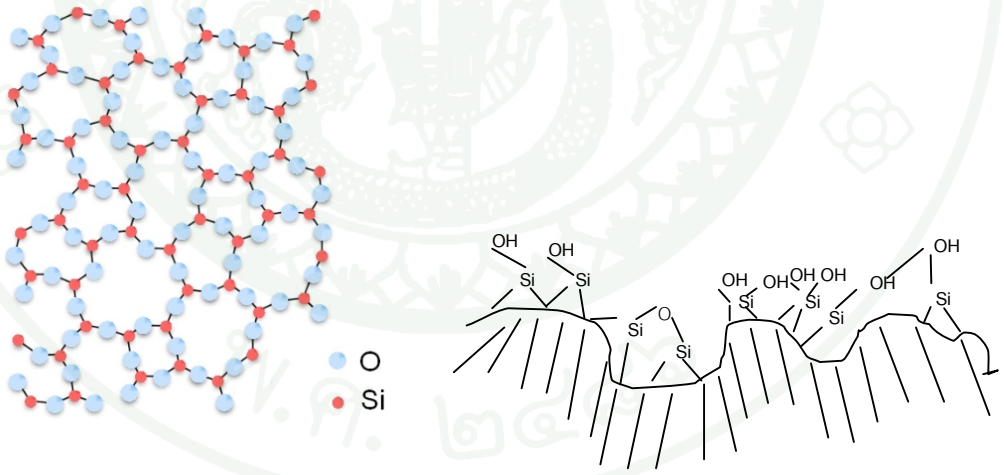
ซิลิกาหรือซิลิคอนไดออกไซด์ (SiO_2) พบที่ผนังเซลล์พืช ซึ่งพืชดูดซึมซิลิกาจากดินเข้ามาเพื่อสร้างความแข็งแรงให้กับต้นพืช ซึ่งจะอยู่ในส่วนของขนหรือคิวติเคิลของใบหรือต้นพืช (ภาพที่ 4) ทำให้พืชมีความหยาบแข็งและเกิดความคมของใบพืช ส่งผลให้ลดความน่ากินและความสามารถในการย่อยได้ของพืชต่ำ ซิลิกาเป็นสาเหตุหลักอย่างหนึ่งที่มีผลลดความสามารถในการย่อยได้ของพืชซึ่งมักถูกมองข้ามไป โดยซิลิกานั้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณลิกนินที่สะสมในพืช ซึ่งจะมีผลโดยตรงต่อเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในพืช โดยสัตว์ไม่มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยซิลิกา ในฟางข้าวพบซิลิกา (Biogenic Silica; $SiO_2.nH_2O$) อยู่ในช่วงตั้งแต่ประมาณ5-23 เปอร์เซ็นต์ ของวัตถุแห้ง ซึ่งก็จะแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ (Van Soest, 1987)

ซิลิกาจะมีความสัมพันธ์ในเชิงลบต่อความสามารถในการย่อยได้ของฟางข้าว โดยซิลิกาในดินที่อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้ (Soluble silica หรือ Silicic acid) เช่น Metasilicic acid (H_4SiO_3),

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Disilicic acid ($H_2Si_2O_5$), Pyrosilicic acid ($H_6Si_2O_7$) เป็นต้น เมื่อถูกดูดซึมเข้ามาในพืชจะจับเป็นโครงข่าย (Polysilicic acid) บนผนังเซลล์ร่วมกับแร่ธาตุในดินอื่นๆ ที่ไม่ละลายน้ำ เช่น Ca, Na, P และ Mg เป็นต้น และตกตะกอนเป็นซิลิกาที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งจะเป็นตัวป้องกันการเข้าย่อยสลายเยื่อใยของเอนไซม์ เช่น Sodium silicate (Liquid glass; Na_2SiO_3), Calcium silicate (Ca_2SiO_3), หรือ Orthosilicic acid (H_4SiO_4) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรีย และยังเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน ในฟางข้าวนั้นพบว่ามีปริมาณซิลิกาสูงกว่าธัญพืชชนิดอื่นๆ (ตารางที่ 1) โดยเฉพาะในส่วนของใบที่มีปริมาณของลิกนินสูงกว่าในส่วนของลำต้น ทำให้ส่วนใบของฟางข้าวสามารถย่อยได้ยากกว่าส่วนลำต้น แต่อย่างไรก็ตาม ถ้าอยู่ในรูปของฟางข้าวสดความสามารถในการย่อยได้ยังคงสูง แต่จะลดลง 10-20 เปอร์เซ็นต์ หากอยู่ในรูปแห้ง (Balasta *et al.* 1987; Doyle *et al.*, 1986; Jung *et al.*, 1993; Lam *et al.,* 2005; Van Soest and Jone, 1968; Van Soest, 2006)

El-Sayed and El-Samni (2006) พบว่า ถ้านำฟางข้าว 1000 kg มาเผา จะได้เถ้าประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ (150 kg) ซึ่งจะประกอบด้วยซิลิกา (SiO_2) ถึง 82 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของซิลิกาที่อยู่ในฟางข้าว

ที่มา: The free encyclopedia (2009b)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 องค์ประกอบและความสามารถในการย่อยได้ของส่วนต่างๆ ของข้าวเจ้า ข้าวบาร์เลย์ และข้าวสาลี

	SiO_2 (g/kg)	Lignin (g/kg)	NDF [a] (g/kg)	ADF (g/kg)	Digestibility (%DM)
Polished rice	0.5	-	-	10	89
Rice bran	50	30	250	140	70
Rice straw	130	52	820	531	45
Rice hulls	230	160	810	720	8
Rice joints	350	120	-	-	0
Barley straw	20	110	800	590	49
Oat straw	20-50	140	700	470	48
Wheat straw	10-50	85-140	828	540	44

หมายเหตุ [a] รวมเถ้า ปราศจากอะไมเลส

ที่มา: ดัดแปลงจาก Van Soest (2006)

ฟางข้าวนับว่าเป็นพืชอาหารหยาบที่สามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่นประเทศไทย และนับว่าเป็นแหล่งอาหารหยาบที่ราคาถูกเมื่อเทียบกับอาหารหยาบอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากฟางข้าวเป็นอาหารหยาบที่มีคุณภาพต่ำ มีโปรตีนประมาณ 3-5 เปอร์เซ็นต์ (ปรีชาและทวีพร, 2551) ซึ่งทำให้สัตว์ที่ได้รับฟางข้าวเพียงอย่างเดียวขาดโปรตีนที่เป็นแหล่งของไนโตรเจนที่จะเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียที่ใช้ในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้การหมักย่อยในกระเพาะรูเมนมีประสิทธิภาพลดลง กรดไขมันที่ระเหยง่ายและจุลินทรีย์โปรตีนลดลง ทำให้สัตว์ได้รับพลังงานและโปรตีนเพื่อการดำรงชีพไม่เพียงพอ (Chowdhury, 1998) ส่งผลให้สมรรถภาพการให้ผลผลิตของสัตว์ลดลง ดังนั้น การใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งอาหารหยาบในสัตว์เคี้ยวเอื้อง จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการเสริมอาหารโปรตีนและพลังงานในอาหารสัตว์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักย่อยอาหารหยาบ หรือต้องมีการจัดการให้สัตว์สามารถใช้ประโยชน์จากฟางข้าวได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด อย่างไรก็ตาม กระบือเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีความสามารถพิเศษในการใช้ประโยชน์จากฟางข้าว โดยที่กระบือที่ได้รับฟางข้าวเพียงอย่างเดียวยังคงสามารถที่จะเจริญเติบโตได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดอื่น เช่น โค จึงเป็นไปได้ว่าในกระเพาะรูเมนของกระบือมีจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายเยื่อใยจากฟางข้าว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กระบือ

กระบือหรือควาย เรียกตามภาษาสัตววิทยาว่า *Bubalus bubalis* เป็นสัตว์ที่จัดอยู่ในไฟลัมสัตว์มีแกนสันหลัง ชั้นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งเป็นที่รู้จักกันในเอเชียก่อนที่จะมีการบันทึกประวัติศาสตร์ เช่น พบว่าประเทศอินเดียเลี้ยงกระบือมาตั้งแต่ 2500 ก่อนคริตส์ศักราช และต่อมาอีกประมาณ 1,000 ปี จึงได้มีการเลี้ยงกระบือในประเทศจีน (ประสบ, 2531) กระบือนับว่าเป็นสัตว์เลี้ยงที่ใกล้ชิดกับงานเกษตรกรรมของประเทศทางเอเชียมากที่สุด เพราะชาวนานิยมเลี้ยงกระบือเป็นแรงงานเพื่อไว้ไถนา หรือใช้กระบือเป็นพาหนะ ในการเข้าไปทำไร่ทำนาและสามารถใช้มูลกระบือเป็นปุ๋ยแก่พืชในไร่นาได้ หรือเลี้ยงกระบือเพื่อกินเนื้อเป็นอาหาร กระบือจึงมีประโยชน์หลายประการ ในทางสัตววิทยาได้จัดหมู่เหล่าของกระบือไว้ ดังนี้ (สารานุกรมเสรีวิกิพิเดีย, 2551)

Kingdom	Animalia
Phylum	Chordata
Class	Mammalia
Order	Artiodactyla
Sub-order	Ruminantia
Family	Bovidae
Genus	*Bubalus*
Species	*B. bubalis*

กระบือเป็นสัตว์กีบคู่ ตัวขนาดใกล้เคียงกับโคโตเต็มวัยเมื่ออายุระหว่าง 5-8 ปี น้ำหนักตัวผู้โตเต็มวัยโดยเฉลี่ย 520-560 กิโลกรัม เพศเมียเฉลี่ยประมาณ 360-440 กิโลกรัม เพศผู้จะใหญ่กว่าเพศเมียเล็กน้อย มีผิวสีเทาถึงดำ (บางตัวมีสีชมพู เรียกว่า กระบือเผือก) มีเขาเป็นลักษณะเด่นเฉพาะตัว ปลายเขาโค้งเป็นวงคล้ายพระจันทร์เสี้ยว อายุกระบือโดยทั่วไปเฉลี่ยประมาณ 25 ปี โดยกระบือที่มีในโลกสามารถแยกได้เป็นสองกลุ่ม คือ กระบือบ้าน และกระบือป่า สำหรับกระบือบ้านนั้นแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ (ประสบ, 2531)

(1) กระบือปลัก (Swamp buffalo)

(2) กระบือแม่น้ำ (River buffalo)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สัตว์ทั้งสองชนิดแม้จะอยู่ในสปีชีส์ เดียวกัน แต่อย่างไรก็ตาม ลักษณะรูปร่างก็มีความแตกต่างกัน และมีจำนวนโครโมโซมต่างกัน โดยกระบือปลัก มีโครโมโซม 2n=48 ส่วนกระบือแม่น้ำ มีโครโมโซม 2n=50 กระบือนับว่าเป็นสัตว์เลี้ยงที่มีความสำคัญต่อเกษตรกรรายย่อย ในชนบทตลอดมา โดยนับว่าเป็นส่วนหนึ่งในระบบการผลิตการทำการเกษตรที่มีการเพาะปลูกเป็นรายได้หลัก นานมาแล้วที่กระบือถูกใช้เป็นแรงงานในการทำการเกษตร การใช้มูลเป็นปุ๋ยและเมื่อมีความจำเป็นก็สามารถขายเป็นรายได้อีกทางหนึ่งด้วย ในขณะเดียวกันสามารถใช้ผลพลอยได้ในไร่นาซึ่งมีราคาถูกมาใช้เป็นอาหารกระบือเลี้ยงเพื่อเปลี่ยนให้เป็นเนื้อสัตว์ที่มีราคาสูงได้

จะสังเกตได้ว่ากระบือพื้นเมือง และโคที่เลี้ยงด้วยอาหารแบบเดียวกันและอยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกันนั้น โคจะมีร่างกายผอมในขณะที่กระบือยังคงสภาพเดิม ซึ่งอาจเนื่องจากความแตกต่างทางด้านสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยา รวมทั้งมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี จึงทำให้กระบือมีความแตกต่างจากโค และเอื้อประโยชน์ในการนำเอาสารอาหารไปเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้อได้ดีกว่าโค (กรมปศุสัตว์, ม.ป.ป.)

Ruangprim และคณะ (2007) รายงานไว้เช่นเดียวกันว่าเมื่อเลี้ยงกระบือ โคเนื้อ และโคนม ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน ได้รับอาหารแบบเดียวกัน พบว่าประชากรของแบคทีเรีย เชื้อรา และระดับของแอมโมเนียในของเหลวในกระเพาะรูเมน ของกระบือสูงกว่าโคเนื้อ และโคนม ตามลำดับ และพบว่าสภาพร่างกายของกระบือมีความสมบูรณ์ที่สุด เมื่อเทียบกับโคเนื้อและโคนม สอดคล้องกับ Sawa และคณะ (1998) ที่รายงานว่ากระบือสายพันธุ์อินเดียมีความสามารถย่อยสลายเยื่อใยของอาหารหยาบที่มาจากวัสดุเศษเหลือจากการเกษตร โดยเฉพาะฟางข้าวสาลีได้ดีกว่าโค และ Wanapat (1995) กล่าวว่า กระบือมีความสามารถในการใช้ประโยชน์จากไนโตรเจนได้ดีกว่าโคและมีประชากรของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยสูงกว่าในโค ทำให้กระบือมีความสามารถในการหมักย่อยสลายเยื่อใยได้ดีกว่าโค

เมธา และคณะ (2552) รายงานว่า กระบือและโคที่ได้รับฟางข้าวเสริมด้วยอาหารข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว พบประชากรของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยบนส่วนของ Digesta ของกระบือสูงกว่าในโค และเมื่อผ่านไป 4 ชั่วโมง ประชากรของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยในส่วนของของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคสูงกว่ากระบือ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า กระบือมีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยคุณภาพต่ำได้ดีกว่าโค

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณการกินได้และการย่อยได้ของอาหารหยาบในกระบือสูงกว่าโค และกระบือมีความสามารถในการใช้ประโยชน์ของไนโตรเจนสูงกว่าโค โดยกระบือปลักมีการกักเก็บไนโตรเจนมากกว่าโค ซึ่งอาจเป็นผลมากจากไตของกระบือมีประสิทธิภาพในการดูดกลับไนโตรเจนมากกว่าโค และระดับแอมโมเนีย (NH_3-N) ในกระเพาะรูเมนของกระบือมากกว่าในกระเพาะรูเมนของโค เมื่อได้รับอาหารหยาบคุณภาพต่ำเหมือนกัน เช่น ฟางข้าว ปริมาณของแอมโมเนียในกระเพาะรูเมนของกระบือที่มีมากกว่าโค ทำให้จำนวนจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของกระบือมีมากกว่าโค ทำให้ประสิทธิภาพการย่อยเยื่อในกระเพาะรูเมนของกระบือดีกว่าในโค (Kawashima *et al.,* 2006; Suwanlee and Wanapat, 1994)

Intaratham และ Wanapat (n.d.); Van Soest (1987) รายงานว่า กระบือมีพฤติกรรมการแทะเล็มในแปลงหญ้าแตกต่างจากโค โดยกระบือจะเดินแทะเล็มช้ากว่าและมีเวลาในการแทะเล็มที่ยาวนานกว่าโค ทำให้กระบือได้รับอาหารต่อเนื่องและมากกว่าโค รวมทั้งกระบือมีระบบทางเดินอาหารที่ใหญ่กว่าโค และมี Retention time ของกระเพาะรูเมนที่ยาวนาน ซึ่ง Sebastian และคณะ (1970) ได้ศึกษาพบว่ากระบือที่มีน้ำหนักตัวมากกว่าโคพันธุ์ซาฮิวาล ทำให้มีระบบทางเดินอาหารที่ใหญ่กว่า จึงอาจทำให้มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยได้ดีกว่าโค ดังนั้นจึงทำให้อาหารที่อยู่ในกระเพาะรูเมนของกระบือ ได้รับการหมักย่อยได้ดีกว่าโค และสารอาหารจะถูกปลดปล่อยออกมามากกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากการหมักย่อยอาหารหยาบคุณภาพต่ำ

จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน (Ruminal microorganism)

จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนประกอบด้วยโปรโตซัว เชื้อรา และแบคทีเรีย จุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นพวกไม่ชอบออกซิเจน เนื่องจากสภาวะแวดล้อมในกระเพาะรูเมนเป็นสภาวะไร้อากาศ มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5.7-7.3 และอุณหภูมิอยู่ในช่วง 36-41 องศาเซลเซียส จำนวนประชากรของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา ตั้งแต่แรกเกิดจนถึงสัตว์โตเต็มที่ และมีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทั้งชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน 10^{10}-10^{11} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (สุริยะ, 2551; Kamra, 2005)

1. โปรโตซัว

โปรโตซัวเป็นจุลินทรีย์ที่มีขนาดใหญ่ (ยาวประมาณ 20-250 ไมโครเมตร) และพบได้บ่อยในกระเพาะรูเมน มีประชากรในกระเพาะรูเมนประมาณ 10^5-10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยแบ่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ออกเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่ม Ciliates ที่ใช้ Cilia ในการเคลื่อนที่ ซึ่งเป็นโปรโตซัวกลุ่มหลักที่พบในกระเพาะรูเมน อีกกลุ่ม คือ กลุ่ม Flagellates ที่ใช้ Flagella ในการเคลื่อนที่ ซึ่งกลุ่มนี้จะพบได้น้อย โปรโตซัวส่วนใหญ่ที่พบในกระเพาะรูเมนจะเจริญในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน โปรโตซัวกลุ่ม Ciliates ซึ่งพบมากที่สุดในกระเพาะรูเมนแบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือ Entodiniomorphida ซึ่งกลุ่มที่พบได้มากที่สุดและมีหลายชนิด โดยจะมีลักษณะ Cilia เป็นกระจุกอยู่ที่ผิวด้านนอกเป็นจุดๆ บริเวณด้านบนหรือด้านข้าง โปรโตซัวกลุ่มนี้จะเป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายทั้งชนิดและปริมาณ ส่วนอีกกลุ่มคือ โปรโตซัวกลุ่ม Holotrich เป็นโปรโตซัวกลุ่ม Ciliate ที่ Cilia ส่วนใหญ่จะกระจายอยู่ทั่วๆ ไปบนผิวด้านนอก ไม่ได้กระจุกตัวอยู่ที่ใดที่หนึ่งเหมือนกลุ่ม Entodiniomorphida โดยมีประชากรในกระเพาะรูเมนประมาณ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ของโปรโตซัวกลุ่ม Ciliate ทั้งหมด

โปรโตซัวส่วนใหญ่จะมีความสัมพันธ์กับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในฐานะผู้ล่ากับผู้ถูกล่า โดยทั้งเชื้อราและแบคทีเรียจะถูกโปรโตซัวกลืนกินและย่อยไปเป็นโภชนะในการเจริญเติบโตของโปรโตซัว นอกจากนี้โปรโตซัวในกลุ่ม Entodiniomorphida ยังสามารถย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสได้ แต่กลุ่ม Holotrich สามารถย่อยแป้งและเฮมิเซลลูโลส แต่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้โปร-โตซัวยังเป็นที่ยึดเกาะของแบคทีเรียหรือเชื้อราบางชนิดบนผิวด้านนอก และภายในไซโตปลาสซึมโดยเฉพาะอย่างยิ่ง แบคทีเรียกลุ่ม Methanogenes ที่สามารถผลิตแก๊สมีเทนได้ หรือแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยได้ แต่อย่างไรก็ตาม โปรโตซัวมีผลเสียมากกว่าผลดีต่อเมตาบอลิซึมของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ไม่ว่าจะเป็นการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง เนื่องจากการกลืนกินจุลินทรีย์ชนิดอื่น การกำจัดโปรโตซัวออกจากกระเพาะรูเมนทำให้ประสิทธิภาพการใช้อาหารของสัตว์เพิ่มขึ้น รวมทั้งทำให้สัตว์มีผลผลิตที่เพิ่มขึ้นด้วย (สุริยะ, 2551)

2. เชื้อรา

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ชนิดยูคาริโอตชั้นต่ำที่สามารถพบได้ทั่วไปในกระเพาะรูเมน โดยเฉพาะในสัตว์ที่ได้รับอาหารหยาบในปริมาณสูงๆ เชื้อราที่พบในกระเพาะรูเมนมีทั้งประเภทที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน แต่เชื้อราส่วนใหญ่ที่พบในกระเพาะรูเมนเป็นกลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจน โดยมีประชากรในกระเพาะรูเมนประมาณ 10^3-10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเชื้อราเหล่านี้เป็นกลุ่มที่มีความสามารถใช้ประโยชน์จากอาหารเยื่อใยที่สัตว์กินเข้าไปได้ดี เชื้อราในกระเพาะรูเมนจะแบ่งออกเป็นสองกลุ่มหลักๆ คือ กลุ่มที่เจริญและอาศัยอยู่บนโปรโตซัว เช่น *Sphaerita hoari* และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sagittospora cameroni และกลุ่มที่เจริญอยู่บนเนื้อเยื่อของอาหารที่สัตว์กินเข้าไป เช่น *Callimastrix fontalis, Piromonas communis,* และ *Sphermonas communis* (สุริยะ, 2551)

วัฏจักรชีวิตของเชื้อราในกระเพาะรูเมน หลังจากที่สัตว์กินอาหารเข้าไปเชื้อราจะเจริญโดยการสร้างสปอร์ สปอร์เหล่านี้จะพบได้ทั้งในส่วนของเหลวและของแข็งในกระเพาะรูเมน แต่ส่วนใหญ่จะพบในส่วนของเหลวและมีความสัมพันธ์กับการใช้โภชนะที่ละลายน้ำได้ ขณะที่สปอร์ที่พบบนของแข็งหรือผิวของอาหารหยาบจะมีความสัมพันธ์กับการใช้อาหารที่เป็นโครงสร้างของพืชโดยจะเข้าไปยึดเกาะกับอาหาร โดยเฉพาะเยื่อใย จากนั้นจะทำการผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยอาหาร ขณะเดียวกันจะสร้าง Rhizoids แทรกเข้าไปในอาหาร (เซลล์พืช) ทำให้เซลล์แตกหรือถูกทำลาย ง่ายต่อการเข้าย่อยของจุลินทรีย์ชนิดอื่น จากนั้นเชื้อราก็จะสร้างสปอร์และปล่อยออกมาย่อยอาหารที่สัตว์กินเข้าไปใหม่ เชื้อราที่อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมนมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่หลากหลาย เพื่อย่อยผนังเซลล์พืช (Extracellular enzymes) และสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนบนเยื่อใยได้เป็นอย่างดี โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่จะหลั่งออกมาในช่วงที่เชื้อรากำลังเจริญและสร้างสปอร์ เช่น เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส ไซลาเนส เซลโลไบเอส เป็นต้น เอนไซม์ที่สร้างขึ้นส่วนใหญ่จะเป็น Multi-enzyme โดยสามารถย่อยเซลลูโลสได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถย่อยลิกนินได้ประมาณ 16 เปอร์เซ็นต์ การย่อยสลายเยื่อใยของเชื้อราจะคล้ายกับการย่อยสลายเยื่อใยของแบคทีเรีย โดยที่เชื้อราทำให้เซลล์พืชแตกจะทำให้เอนไซม์จากแบคทีเรีย (Fibrolytic bacteria) เข้าไปยึดเกาะและย่อยสลายเยื่อใยพืชได้ง่ายขึ้น จึงเป็นการทำงานร่วมกันระหว่างแบคทีเรียและเชื้อราในการย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมน แต่อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียถือว่าเป็นจุลทรีย์ที่มีบทบาททั้งปริมาณและหน้าที่ในการย่อยสลายเยื่อใยมากกว่าเชื้อรา (สุริยะ, 2551)

3. แบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนที่มีประชากรสูงที่สุด แบคทีเรียจึงเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญที่สุดในการหมักย่อยในกระเพาะรูเมน แบคทีเรียในกระเพาะรูเมนมีประชากรประมาณ 10^{10}-10^{11} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสามารถแบ่งตามแหล่งที่อยู่อาศัยในกระเพาะรูเมนออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในส่วนที่เป็นของเหลวในกระเพาะรูเมนมีประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลุ่มที่ 2 แบคทีเรียที่อาศัยเกาะอยู่บนส่วนของแข็งในกระเพาะรูเมน ซึ่งเป็นกลุ่มที่พบมากที่สุดมีประมาณ 70-75 เปอร์เซ็นต์ ของแบคทีเรียทั้งหมด

กลุ่มที่ 3 แบคทีเรียที่อาศัยอยู่บนเยื่อบุผนังกระเพาะรูเมนกลุ่มนี้พบประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ของแบคทีเรียทั้งหมดและมีความสำคัญน้อยมากต่อการย่อยอาหารในกระเพาะรูเมน

กลุ่มที่ 4 แบคทีเรียที่อาศัยอยู่บนผิวของโปรโตซัวและเชื้อรา กลุ่มนี้พบไม่ถึง 1 เปอร์เซ็นต์ ของแบคทีเรียทั้งหมดและมีความสำคัญต่อการย่อยอาหารในกระเพาะรูเมนน้อยมากเช่นกัน

แบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีบทบาทหน้าที่ในการหมักย่อยอาหารที่สัตว์กินเข้าไปแตกต่างกันออกไป ไม่ว่าจะเป็นการย่อยโปรตีน ไขมัน หรือคาร์โบไฮเดรต ทั้งชนิดที่เป็นโครงสร้างหรือชนิดที่ไม่เป็นโครงสร้างของพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งการหมักย่อยคาร์โบไฮเดรตชนิดโครงสร้างที่มีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก (15-70 เปอร์เซ็นต์) ของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ได้เป็นกรดไขมันที่ระเหยง่าย (Volatile fatty acid; VFA) (>70 เปอร์เซ็นต์ ของพลังงานทั้งหมด) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานหลักให้แก่สัตว์เคี้ยวเอื้อง อีกทั้งยังเป็นแหล่งของโปรตีน (Microbial protein) ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดอาจมีความสามารถในการย่อยอาหารที่หลากหลาย โดยสามารถย่อยได้ทั้งโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากสัตว์เคี้ยวเอื้องนั้นได้รับอาหารหยาบซึ่งอยู่ในรูปของคาร์โบไฮเดรตชนิดที่เป็นโครงสร้างเป็นหลัก ดังนั้น แบคทีเรียกลุ่มที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใย จึงเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสำคัญต่อการหมักย่อยในกระเพาะรูเมน (กฤษ, 2547; สุริยะ, 2551.; Atasoglu *et al.*, 2001; Ruangprim *et al.*, 2007; Wanapat *et al.*, n.d; Weimer, 1998)

แบคทีเรียที่มีหน้าที่หลักในการย่อยสลายเยื่อใยที่พบมากในกระเพาะรูเมนมีดังนี้ (สุริยะ, 2551)

3.1 *Fibrobacter succinogenes*

F. succinogenes เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง และในระบบทางเดินอาหารส่วนท้าย (ลำไส้ใหญ่และไส้ติ่ง) ของสัตว์กระเพาะเดี่ยวที่กินพืชเป็นอาหารหลัก โดยมีหน้าที่หลักในการย่อยเซลลูโลส เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมลบ (สีแดง) มีเซลล์ขนาดเล็กคล้ายรูปไข่หรือเป็นท่อนสั้น (Rod) สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเซลโลไบโอสหรือกลูโคสเป็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แหล่งคาร์บอนได้ แต่มีลักษณะเด่น คือ สามารถเจริญในอาหารที่มีเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสและไซเล็มได้ แต่ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีไซเล็มได้และไม่สามารถใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ผลิตสุดท้ายเป็น อะซิเตท (Acetate) และซัคซิเนท (Succinate) นอกจากนี้อาจผลิตฟอร์เมท (Formate) และวาลาเรท (Valerate) ได้ด้วย ส่วนใหญ่เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะพบเป็นเซลล์เดี่ยวๆ แต่อาจต่อกันเป็นสายสั้นๆ และไม่สามารถเจริญในสภาวะที่มี pH ต่ำกว่า 6 ได้

F. succinogenes จะเข้ายึดเกาะกับอาหารเยื่อใยแต่จะไม่เกาะกับอาหารที่เป็นแป้ง จากนั้นจะผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) และไซลาเนส (Xylanase) ออกมาย่อยผนังเซลล์พืช ได้เป็นเซลลูโลสสายสั้น (Cello-oligosaccharides) หรือเซลโลไบโอส (Cellobiose) จากนั้นจะผลิตเอ็กโซกลูคาร์เนส (Exoglucanase) และเซลโลไบเอส (Cellobiase) ออกมาย่อยเพื่อให้ได้กลูโคส นอกจากนี้ *F. succinogenes* เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการทนต่อยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ได้ดี

3.2 *Ruminococcus flavefaciens*

R. flavefaciens เป็นแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก (สีน้ำเงิน) หรืออาจย้อมติดสีแกรมลบได้ด้วย มีลักษณะเซลล์กลม (Cocci) เซลล์มีขนาดเล็ก เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อจะต่อกันเป็นสายยาว เซลล์ของ *R. flavefaciens* สามารถผลิตเม็ดสีเหลืองได้เมื่อเจริญบนเซลลูโลส เป็นแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในการย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมน โดยจะให้ผลิตสุดท้ายจากการหมัก คือ อะซิเตท และซัคซิเนท

3.3 *Ruminococcus albus*

R. albus เป็น *Ruminococcus* spp. อีกชนิดหนึ่งที่บทบาทสำคัญในการย่อยสลายเยื่อใย จะมีลักษณะเซลล์เช่นเดียวกับ *R. flavefaciens* แต่จะย้อมติดฉพาะสีแกรมบวก และไม่สามารถผลิตเม็ดสีเหลืองได้เหมือน *R. flavefaciens* เมื่อเจริญบนเซลลูโลส โดยทั่วไปจะพบเซลล์อยู่เป็นคู่ๆ ผลผลิตสุดท้ายของ *R. albus* คือ ฟอร์เมท อะซิเตท เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน

Ruminococcus spp. ทั้งสองชนิดเป็นแบคทีเรียที่ต้องการโภชนะพื้นฐานในการเจริญเหมือนกัน มีความสามารถในการใช้กรดอะมิโนหรือเปปไทด์เป็นแหล่งของไนโตรเจนได้ต่ำ แต่จะ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดี ลักษณะเด่นของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ คือ เมื่อเจริญบนอาหารเซลลูโลส จะสามารถย่อยเซลลูโลส และบริเวณรอบๆ โคโลนีจะใส่กว่าบริเวณอื่น (Clearzone) *Ruminococcus* spp. จะสามารถใช้เซลโลไบโอสได้ดีกว่ากลูโคส และสามารถใช้เซลลูโลสสายสั้นที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสสายยาวได้ และสามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสได้น้ำตาลไซโลสเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตได้ ส่วนใหญ่ในกระเพาะรูเมนจะพบ *R. flavefaciens* ได้มากกว่า *R. albus* ขึ้นกับชนิดของอาหาร

อย่างไรก็ตาม ในกระเพาะรูเมนยังมีแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่สามารถย่อยสลายเยื่อใยได้ เช่น *Butyrivibrio fibrisolvens, Prevotella ruminicola* เป็นต้น ซึ่งอาจมีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยที่แตกต่างกัน และอาจจะยังมีแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยอีกหลายชนิดที่ยังไม่ได้รับการค้นพบหรือคัดแยกเชื้อจากกระเพาะรูเมนซึ่งจะต้องศึกษากันต่อไป แต่จากที่กล่าวมาในข้างต้น *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* และ *R. albus* เป็นแบคทีเรียย่อยเยื่อใยที่พบมาก และมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมน โดยเฉพาะ *F. succinogenes* พบว่ามีบทบาทสำคัญที่สุดและพบมากที่สุดในกระเพาะรูเมน (สุริยะ, 2551; Chen and Weimer, 2001; Kobayashi, 2006; Satoshi *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008; Varel, 1989; Weimer, 1998)

จำนวนและชนิดของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ไม่ว่าจะเป็นอาหารที่สัตว์ได้รับ ระยะเวลาในการหมักย่อยในกระเพาะรูเมน สภาพความกรด-ด่างของกระเพาะรูเมน ความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน เป็นต้น

Brigitte และคณะ (2001) รายงานว่าในกระเพาะรูเมนของแกะที่ได้รับถั่วอัลฟาฟ่า พบประชากรแบคทีเรียที่ยึดเกาะอยู่อย่างหนาแน่นบนส่วนของแข็ง เป็นแบคทีเรียที่ย่อยสลายเยื่อใย ซึ่งพบมากกว่าในส่วนของเหลว โดยแบคทีเรียที่พบมากที่สุด คือ *F. succinogenes*, *R. albus* และ *R. flavefaciens* ตามลำดับ

Vincent และคณะ (1989) รายงานว่าโคที่ได้รับอาหารเป็นถั่วอัลฟาฟ่า: ข้าวโพด ในอัตราส่วน 100:0, 75:25 และ 50:50 ประชากรของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย *F. succinogenes* และ *R. albus* ลดลง ตามลำดับ แต่ประชากรของแบคทีเรีย *B. fibrisolvens* ที่สามารถย่อยเฮมิเซลลูโลส แป้งสายยาว และเพคตินได้ เพิ่มขึ้น เมื่อสัดส่วนของถั่วอัลฟาฟ่าลดลง ทั้งนี้เนื่องจากในอาหารที่มีข้าวโพดเป็นส่วนประกอบ มีสัดส่วนของเฮมิเซลลูโลส และแป้งเพิ่มขึ้น มีผลผลิตของกลูโคสเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นตัวจำกัดความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของแบคทีเรียทั้งสองกลุ่ม และใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้าวโพดที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลสเพียง 19.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ อาหารที่มีถั่วอัลฟาฟ่า 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีองค์ประกอบของเซลลูโลสถึง 38.1 เปอร์เซ็นต์ และสัตว์ที่ได้รับอาหารที่มีข้าวโพดเป็นส่วนประกอบ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.68 ส่วนในสัตว์ที่ได้รับอาหารที่มีถั่วอัลฟาฟ่าเพียงอย่างเดียวมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.94 ซึ่งแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยจะทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อกระเพาะรูเมนมีสภาพเป็นกรดอ่อนๆ (pH 6.80) (Ogimoto และ Imai, 1981)

Sawanon (2006) รายงานว่า *Selonomonas ruminantium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถย่อยสลายเยื่อใยได้ แต่สามารถใช้ผลผลิตของ *F. succinogenes* และ *R. flavefaciens* เช่น น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลสายสั้น เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต และยังสามารถเปลี่ยนซัคซิเนทที่แบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยผลิตขึ้นไปเป็นโพรพิโอเนทได้อย่างมีประสิทธิภาพ ขณะเดียวกัน *S. ruminantium* ก็ผลิตวิตามินบี 12 และแอมโมเนียให้กับแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายเยื่อใย นอกจากนี้ยังสันนิษฐานว่า *S. ruminantium* นั้นสามารถให้ *F. succinogenes* และ *R. flavefaciens* (ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้เอง) ยึดเกาะบนเซลล์และช่วยในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียเหล่านี้ได้ นอกจากนี้ *S. ruminantium* ยังสามารถเปลี่ยนกรดแลคติกและกรดซัคซินิคไปเป็นโพรพิโอนิค ซึ่งเป็นการลดการสะสมของแลคติกและซัคซินิคจะทำให้สภาพความกรด-ด่างในกระเพาะรูเมนสูงขึ้น ทำให้แบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น

แต่อย่างไรก็ตาม การหมักย่อยของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน ทั้งแบคทีเรีย โปรโตซัว และเชื้อรา มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด ทั้งในด้านการพึ่งพาอาศัยกัน (Symbiosis) หรือการแข่งขันกัน (Antagonism) โดยจะมีผลดีและผลเสียต่อการหมักย่อยอาหารในกระเพาะรูเมน ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ของโภชนะ และอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมเกี่ยวกับการปล่อยแก๊สมีเทนหรือของเสียที่เหลือจากการหมักย่อยที่ถูกปล่อยออกทางมูลอีกด้วย

4. กลไกการย่อยสลายเยื่อใยของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องมีส่วนประกอบหลักเป็นอาหารหยาบ แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญที่สุดในกระบวนการหมักย่อยอาหารหยาบในกระเพาะรูเมน เมื่อเปรียบเทียบกับโปรโตซัวและเชื้อรา ทั้งในด้านจำนวนประชากรแบคทีเรียที่มีมากกว่า และประสิทธิภาพของการย่อยสลายเยื่อใยของแบคทีเรียที่มีสูงกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโปรโตซัวที่ให้ผลเสียมากกว่าผลดีต่อการหมักย่อยในกระเพาะรูเมน (สุริยะ, 2551)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลไกในการย่อยอาหารเยื่อใยของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน (ภาพที่ 5) เกิดขึ้นเมื่อสัตว์เคี้ยวเอื้องบดอาหารจนมีขนาดเล็กลง ซึ่งการเคี้ยวเอื้องจะทำให้อาหารมีขนาดเล็กลง เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวบนอาหาร หลังจากนั้นเมื่ออาหารเข้าไปในกระเพาะรูเมน แบคทีเรียจะเริ่มเข้ามายึดเกาะกับอาหารแบบสุ่ม ซึ่งอาจเป็นการเคลื่อนที่มาเกาะบนเยื่อใยด้วยตัวเองหรือเกาะมากับจุลินทรีย์ชนิดอื่น หลังจากนั้นถ้าเป็นเยื่อใยชนิดที่แบคทีเรียนั้นชอบหรือสามารถใช้ประโยชน์จากเยื่อใยนั้นได้ แบคทีเรียชนิดนั้นก็จะยึดเกาะต่อไปและเจริญบนเยื่อใยชนิดนั้น แต่ถ้าไม่สามารถใช้ประโยชน์จากเยื่อใยชนิดนั้นได้ แบคทีเรียก็จะไม่เกาะกับเยื่อใยชนิดนั้นอีกต่อไป แต่จะไปจับกับอาหารชนิดใหม่ที่เข้ามาในกระเพาะรูเมน

แบคทีเรียที่เข้ามายึดเกาะกับอาหารเยื่อใยซึ่งเป็นแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย มีมากที่สุดในกระเพาะรูเมน ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียกลุ่มหลักนี้ถือว่าเป็นกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดในการย่อยอาหาร โดยจะเข้ายึดเกาะกับเยื่อใยมากที่สุดในช่วง 12-18 ชั่วโมง หลังจากสัตว์ได้รับอาหาร (Leedle *et al.,* 1982) แบคทีเรียที่ย่อยสลายเยื่อใยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (เมธา, 2547) แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ประมาณ 80-91 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย 3 กลุ่มหลักๆ คือ (สุริยะ, 2551)

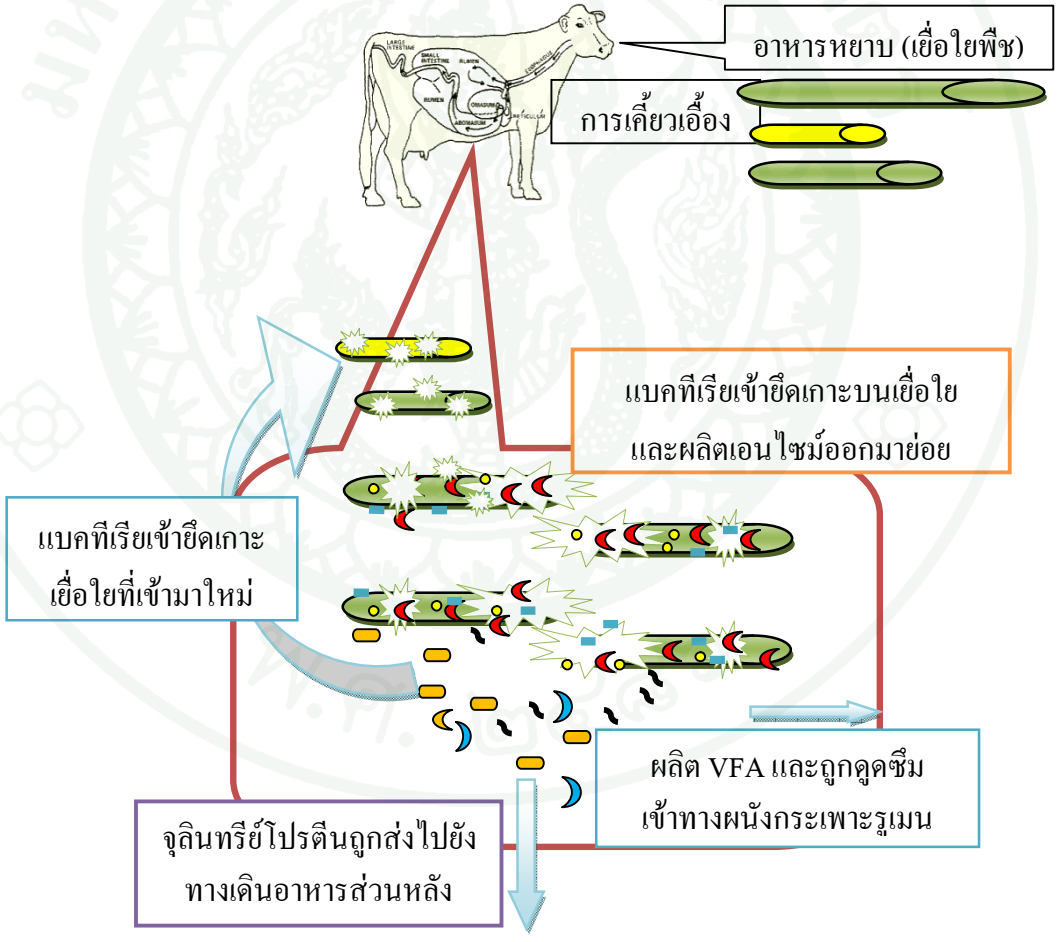
กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียที่มีหน้าที่ย่อยสลายเยื่อใยโดยตรง แบคทีเรียกลุ่มนี้ทำหน้าที่ย่อยสลายเยื่อใยได้เท่านั้น แต่อาจจะย่อยเซลลูโลส (Cellulolytic bacteria) หรือ เฮมิเซลลูโลส (Hemicelluololytic bacteria) เพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง หรือทั้งสองอย่าง

กลุ่มที่ 2 แบคทีเรียที่ไม่ได้ย่อยสลายเยื่อใยโดยตรง (Non-fibrolytic bacteria) แบคทีเรียกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ในการย่อยเซลล์พืชที่เป็นพวกแป้งหรือส่วนที่ไม่ใช่โครงสร้างของผนังเซลล์พืช (Non-structure carbohydrates) และสามารถใช้ผลผลิตของแบคทีเรียในกลุ่มที่ย่อยสลายเยื่อใย เช่น เซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลสสายสั้นๆ หรือน้ำตาลต่างๆได้

กลุ่มที่ 3 แบคทีเรียที่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดและบทบาทหน้าที่ที่แน่นอนในกระเพาะรูเมน (Unknown bacteria) แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียที่ยังไม่สามารถแยกเชื้อออกมาเพื่อศึกษาคุณสมบัติเฉพาะตัวของมันได้ ดังนั้นแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงยังไม่ทราบบทบาทหน้าที่ที่ชัดเจนในกระเพาะรูเมน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หลังจากนั้นแบคทีเรียจะเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์บนอาหารหรือเยื่อใยที่ตัวเองสามารถย่อยและใช้ประโยชน์ได้ และทำการสร้าง Glycocalyx (สุริยะ, 2551; Weimer *et al.*,2006) ขึ้นมาคลุมเซลล์และผลิตเอนไซม์ ออกมาย่อยอาหารนั้นๆ โดยภายใน Glycocalyx จะประกอบด้วย Multienzyme complexes หรือ Cellulosome ซึ่งจะแตกต่างกันไปในแบคทีเรียแต่ละชนิด เมื่ออาหารหรือเยื่อใยถูกย่อยแล้ว แบคทีเรียส่วนหนึ่งจะหลุดออกจากอาหาร แล้วไปยึดเกาะกับอาหารหรือเยื่อใยชนิดใหม่ที่เข้ามาในกระเพาะรูเมน และแบคทีเรียอีกส่วนหนึ่งจะเกาะไปกับอาหารหรือเยื่อใยที่ย่อยได้แต่ยังไม่สมบูรณ์หรือในส่วนที่เป็นของเหลว แล้วผ่านเข้าไปในระบบทางเดินอาหารส่วนหลัง (ลำไส้เล็ก) และถูกเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารส่วนหลังของสัตว์ ย่อยและดูดซึมไปใช้ประโยชน์ต่อไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนที่เป็นเซลล์โปรตีนของแบคทีเรีย เช่น กรดอะมิโนต่างๆ



ภาพที่ 5 กระบวนการย่อยสลายเยื่อใยของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

ที่มา: ดัดแปลงจาก สุริยะ (2551)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การคัดเลือกแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมน

จากที่กล่าวมาแล้วในข้างต้นว่ากระบือนั้นเป็นสัตว์ที่มีความสามารถในการใช้อาหารหยาบคุณภาพต่ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฟางข้าวเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดอื่น ไม่ว่าจะเป็นโคเนื้อหรือโคนม เนื่องจากในกระเพาะรูเมนของกระบือมีจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงที่หมักย่อยอาหารหยาบคุณภาพต่ำได้ดี (กรมปศุสัตว์, ม.ป.ป.; Ruangprim *et al.,* 2007; Sawa *et al.*, 1998) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย ซึ่งพบว่าในกระเพาะรูเมนของกระบือสูงกว่าในโค (Wanapat *et al.,* 2000)

อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับนิเวศน์วิทยาของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกระบือในอดีตที่ผ่านมานั้น ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในเชิงปริมาณ โดยใช้วิธีการแบบดั้งเดิม (Convention methods) ไม่ว่าจะเป็นการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดผ่านกล้องจุลทรรศน์ (Microscopic count) หรือการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture count) การย้อมติดสีของเซลล์ (Gram staining) (Ogimoto and Imai, 1981; Sawanon and Kobayashi, 2006) ซึ่งวิธีการต่างๆ เหล่านี้ล้วนมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น การใช้วิธี Microscopic count แบคทีเรียที่ได้จากการศึกษาเป็นแบคทีเรียที่ตายแล้ว ไม่สามารถนำกลับมาเพิ่มจำนวนได้อีก และเป็นการบอกให้ทราบถึงจำนวนเพียงคร่าวๆ หรือการใช้วิธี Culture count เป็นการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหารแข็ง (Solid media) ซึ่งก็มีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เนื่องจากการศึกษานิเวศน์วิทยาของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน แบคทีเรียส่วนใหญ่จะเจริญได้ในสภาวะไร้ออกซิเจนเท่านั้น (Strictly anaerobic bacteria)

ดังนั้น การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อต้องปราศจากออกซิเจน หรืออาจมีแบคทีเรียบางกลุ่มที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเล็กน้อย (Aerobic or Facultatively anaerobic bacteria) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีออกซิเจนอยู่ด้วยจึงจะเจริญได้ดี แต่แบคทีเรียหลายชนิดไม่สามารถเจริญบนอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง อาจเนื่องมาจากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไม่มีสารอาหารที่จำเป็นบางชนิด (Growth factor) ที่แบคทีเรียเหล่านั้นต้องการเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต หรือแบคทีเรียหลายชนิดที่ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารแข็งหรือเจริญได้ช้ามาก หรือมีจำนวนประชากรน้อยจนไม่สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญขึ้นได้ แต่อย่างไรก็ตาม วิธีนี้มีข้อดีคือแบคทีเรียที่เจริญขึ้นเป็นแบคทีเรียที่ยังมีชีวิตอยู่ การศึกษานิเวศน์วิทยาของกระบวนการหมักย่อยในกระเพาะรูเมนมีการศึกษากันมานานแล้ว โดยในปัจจุบันสามารถจำแนกและบ่งเชื้อแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนได้มากกว่า 5,000 ชนิด (Species) แต่เป็นเพียงแค่ 5-10 เปอร์เซ็นต์ ของแบคทีเรียทั้งหมดที่มีอยู่ในกระเพาะรูเมน หรือ 10-20 เปอร์เซ็นต์ ของแบคทีเรียที่ยึดเกาะอยู่บนเยื่อใย (สุริยะ, 2551; McSweeney *et al.,* 1999) เนื่องจากข้อจำกัดในการศึกษาหลายๆ ประการดังที่กล่าวในข้างต้น และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยังมีปัจจัยอีกหลายประการที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ยังไม่ทราบชนิด ซึ่งมีผลต่อความยากของการเพาะเลี้ยงและจำแนกเชื้อแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน (Kobayashi, 2006)

อย่างไรก็ตาม วิธีการต่างๆ เหล่านี้เป็นวิธีการพื้นฐานที่ใช้ในการศึกษาคุณสมบัติและบทบาทต่างๆ ของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาความหลากหลายและการบ่งชื่อเชื้อจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน และในปัจจุบันได้มีการพัฒนา โดยนำเอาวิธีการด้านชีวโมเลกุล (Molecular methods) มาใช้ในการศึกษาเพื่อให้เกิดความถูกต้องแม่นยำและมีความสะดวกรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

5.1 การบ่งจำแนกชนิดของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

5.1.1 การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีการแบบดั้งเดิม

การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแบบดั้งเดิม เป็นวิธีการที่ใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ใช้มาตั้งแต่ในอดีตจนถึงปัจจุบัน ทำได้โดยเมื่อแยกหรือคัดเลือกแบคทีเรียจากกระเพาะรูเมนออกมาได้แล้ว ก็นำแบคทีเรียที่ต้องการบ่งชี้ชนิดมาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้ (สุริยะ, 2551)

1) คุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะภายนอกของเซลล์ ซึ่งแบคทีเรียจะแบ่งตามลักษณะรูปร่างภายนอกที่มองเห็นผ่านกล้องจุลทรรศน์เป็น 3 กลุ่ม คือ รูปร่างกลม (Cocci) รูปร่างเป็นท่อนตรงหรือโค้ง (Rod) และรูปร่างเป็นเกลียว (Spirilla) และลักษณะการเจริญของเซลล์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น เจริญเป็นเซลล์เดี่ยว การต่อกันของเซลล์เป็นคู่ ต่อกันเป็นสายยาว หรือต่อกันเป็นสายสั้นๆ

2) องค์ประกอบของเซลล์ ได้แก่ ลักษณะของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยดูการย้อมติดสีของเซลล์ แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ แบคทีเรียแกรมบวก (Gram-possitive) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีโครงสร้างของผนังเซลล์ ประกอบด้วยชั้นบางๆ ของ Peptidoglycan และ Cytoplasmic membrane ที่ค่อนข้างหนา อีกกลุ่มคือ แบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีโครงสร้างของผนังเซลล์ประกอบด้วยชั้นบางๆ ของ Peptidoglycan-lipopolysaccharides และมี Membrane 2 ชั้น (Outer membrane และ Cytoplasmic membrane)

3) อัตราส่วนของเบส A+T และ G+C สิ่งมีชีวิตทุกชนิดจะมีปริมาณของเบสพิวรีนเท่ากับปริมาณของไพริมิดีน โดยปริมาณของ A เท่ากับ T และปริมาณ C เท่ากับ G ใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ต่างชนิดกันจะมีอัตราส่วนของ A+T/G+C ที่แตกต่างกัน และถูกแสดงในรูปของค่าเปอร์เซ็นต์ GC (จุรีย์รัตน์, 2550)

4) คุณสมบัติทางเคมี ได้แก่ความสามารถในการใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ หรือคาร์โบไฮเดรทสายยาวต่างๆ เนื่องจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนมีความจำเพาะในการใช้ประโยชน์ของโภชนะสูงมาก เช่น *F. succinogenes* สามารถเจริญในอาหารที่มีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ไม่สามารถใช้ประโยชน์จากไซโลสได้ นอกจากนี้ยังดูความสามารถในการผลิตผลผลิตสุดท้ายว่าได้อะไรบ้าง เช่น อะซิเตท โพรพิโอเนท และบิวทิเรท รวมทั้งกรดแลคติก ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และมีเทน เป็นต้น โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีผลผลิตสุดท้ายที่แตกต่างกัน เช่น *F. succinogenes* และ *R. flavefaciens* ที่มีผลผลิตสุดท้ายเป็น อะซิเตท และซัคซิเนท หรือ *R. albus* ที่มีผลผลิตสุดท้ายเป็น ฟอร์เมท อะซิเตท เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน เป็นต้น

เมื่อทำการศึกษคุณสมบัติต่างๆ ดังกล่าว จากนั้นนำคุณสมบัติทั้งหมดเหล่านี้มาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อบ่งชี้ว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใด อย่างไรก็ตาม การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีนี้ต้องใช้ระยะเวลานานและเสียค่าใช้จ่ายสูง ในปัจจุบันจึงได้มีการพัฒนาโดยนำเอาวิธีการทางด้านชีวโมเลกุลมาใช้ในการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น

5.1.2 การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียโดยวิธีการด้านชีวโมเลกุล

การใช้เทคโนโลยีด้านชีวโมเลกุลเพื่อบ่งชนิดของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนได้พัฒนามาจากความรู้พื้นฐานที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธีแบบดั้งเดิม โดยอาจไม่ต้องมีการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Kobayashi, 2006) โดยนำความรู้เกี่ยวกับ 16S ribosomal RNA (Small subunit rRNA) มาประยุกต์ใช้

rRNA เป็นโครงสร้างสำคัญที่ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน ที่ถูกสังเคราะห์จาก DNA ในโครโมโซมที่อยู่ในนิวเคลียส ขนาดของ rRNA สามารถวัดได้จากอัตราการเคลื่อนที่ภายใต้แรงเหวี่ยง มีหน่วยเป็น Svedberg; S (1 S = 10^{-11} วินาที) rRNA ของแบคทีเรีย (Prokaryote) มีขนาด 70S ซึ่งประกอบด้วย 2 หน่วย (Subunit) คือ หน่วยเล็ก (Small subunit) ขนาด 30S จะมี RNA เป็นองค์ประกอบ ขนาด 16S และหน่วยใหญ่ (Large subunit) ขนาด 50S มี RNA 2 หน่วยย่อยเป็นองค์ประกอบ คือ 5S และ 23S ยีนของไรโบโซมบนโครโมโซมที่ใช้ในการสังเคราะห์ RNA จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับ RNA ที่สร้างขึ้นและเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้เป็นดัชนีในการจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ (สุริยะ, 2551)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปัจจุบันได้มีการนำเอาลักษณะเฉพาะตัวของ rRNA มาใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน เนื่องจากข้อจำกัดในการจำแนกชนิดด้วยวิธีดั้งเดิมดังที่กล่าวในข้างต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 16S rRNA ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง (สุริยะ และ Kobayashi, 2550; Edwards *et al.,* 2004; Kobayashi, 2006, 2007; Kocherginskaya *et al*., 2001; Wanapat, n.d) โดยมีการเก็บรวบรวมข้อมูลลำดับเบสของ 16S rRNA มากกว่าล้านเส้นไว้ในฐานข้อมูลของธนาคารยีน (GenBank, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ดังนั้น จึงมีการใช้ข้อมูลของ 16S rRNA มาใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยเป็นที่ยอมรับกันว่าถ้าข้อมูลของ 16S rRNA ของแบคทีเรียชนิดใดๆ มีความเหมือนกันมากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ ให้ถือว่าเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน แต่ถ้าเหมือนกันน้อยกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ ให้ถือว่าเป็นแบคทีเรียต่างชนิดกัน หรือเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ ในปัจจุบันเชื่อว่ามีแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนที่สามารถเพาะเลี้ยงและจำแนกได้เพียง 5-10 เปอร์เซ็นต์ ของแบคทีเรียทั้งหมด (สุริยะ, 2551; Kobayashi, 2006) ดังนั้การแยกเชื้อแบคทีเรียจากกระเพาะรูเมนจึงมีโอกาสพบแบคทีเรียชนิดใหม่ได้เสมอ แต่อย่างไรก็ตาม 16S rRNA ถูกสร้างมาจาก DNA ของโครโมโซมที่อยู่ในนิวเคลียสส่วนที่เป็น 16S rDNA เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน ดังนั้นจึงมีการใช้ลำดับเบสของ rDNA มาใช้ในการเปรียบเทียบแทน (สุริยะ, 2551)

6. การพัฒนาจุลินทรีย์เพื่อใช้เสริมในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง

ปัจจุบันการพัฒนาจุลินทรีย์เพื่อที่จะนำมาเสริมในอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักย่อยในกระเพาะรูเมน ส่วนใหญ่จะเป็นการใช้เทคโนโลยีด้านพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) เพื่อปรับเปลี่ยนพันธุกรรมของจุลินทรีย์ให้มีศักยภาพในการหมักย่อยในกระเพาะรูเมนให้ดีขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม การใช้เทคโนโลยีด้านพันธุวิศวกรรมนั้น มีข้อจำกัดอยู่หลายประการ ไม่ว่าเป็นการไม่ได้รับการยอมรับในการใช้จุลินทรีย์ปรับเปลี่ยนพันธุกรรมในสัตว์เลี้ยง หรือจุลินทรีย์ที่ได้รับการปรับเปลี่ยนพันธุกรรมนั้นไม่สามารถคงอยู่ในกระเพาะรูเมนของสัตว์เลี้ยงได้

Cummins และ Ho (2006) รายงานว่าการใช้จุลินทรีย์ที่ปรับเปลี่ยนพันธุกรรมในกระเพาะรูเมนนั้น จุลินทรีย์ดังกล่าวไม่สามารถทนอยู่ในกระเพาะรูเมนได้เนื่องจากความซับซ้อนของระบบนิเวศน์ในกระเพาะรูเมน มักตกเป็นเหยื่อของจุลินทรีย์ประจำถิ่น โดยเฉพาะโปรโตซัว การใช้จุลินทรีย์ปรับเปลี่ยนพันธุกรรมอาจก่อให้เกิดความไม่สมดุลทางระบบนิเวศน์ของกระเพาะรูเมนได้ และอาจเป็นสาเหตุก่อเกิดโรคในสัตว์และส่งผลกระทบถึงมนุษย์ซึ่งบริโภคผลผลิตจากสัตว์นั้นได้ และยังกล่าวถึงการใช้แบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย *B. fibrisolvens* ที่ปรับเปลี่ยนพันธุกรรมโดยการตัดแต่งเพิ่มยีนผลิตไซลาเนสจากเชื้อราและยีนต่อต้านสารปฏิชีวนะ Erythromycin เข้าไป พบว่าเมื่อปลูกถ่ายเชื้อ (Inoculated) เข้าไปในกระเพาะรูเมนของแกะที่ได้รับหญ้าแห้ง ปรากฏว่าแบคทีเรีย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดังกล่าวถูกกำจัดหมดไปภายใน 12 ชั่วโมง แต่ถ้าปลูกถ่ายเชื้อในสารละลายรูเมนที่ทำการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันแล้ว แบคทีเรียดังกล่าวสามารถเจริญอยู่ได้ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียดังกล่าวถูกกำจัดโดยจุลินทรีย์ประจำถิ่น และยังพบอีกว่า แบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย *Ruminococcus* spp. และ *Fibrobacter* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่ย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมน ไม่ยอมรับการตัดต่อยีนเข้าไป มีเพียง *Butyrivibrio* sp. เท่านั้นที่ยอมรับยีนที่ตัดแต่งเข้าไป และการตัดต่อยีน Flouroacetate dehalogenase จากแบคทีเรียในดิน *Moraxella* ให้กับ *B. fibrisolvens* และปลูกถ่ายเชื้อให้กับแกะที่ได้รับพืชที่สารพิษ Flouroacetate อยู่สูง ซึ่งมีอยู่ทั่วไปในออสเตรเลีย ปรากฏว่าสามารถลดพิษดังกล่าวได้ แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียดังกล่าวก็ไม่สามารถคงอยู่ในกระเพาะรูเมนได้นาน เนื่องระบบนิเวศน์ในกระเพาะรูเมนมีความต่อต้านต่อแบคทีเรียที่ผ่านการปรับเปลี่ยนพันธุกรรม และแบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมของกระเพาะรูเมนของแกะได้

Liu และคณะ (2005) รายงานเกี่ยวกับการประสบความสำเร็จในการตัดต่อยีนที่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยของจุลินทรีย์ย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมน *Neocallimastix patriciarum* xylanase gene *xynCDBFV*, *F. succinogenes* glucanase (1,3-1,4-D-glucan 4-glucanohydrolase [EC 3.2.1.73]) gene, และ *Piromyces rhizinflata* Cellulase gene *eglA* ให้กับแบคทีเรีย *Lactobacillus reuteri* ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกในสุกรและไก่ และยีนเหล่านี้สามารถแสดงออกได้ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์

อย่างไรก็ตาม Forano และ Flint (2000) รายงานสอดคล้องกับ Keese (2008) โดยกล่าวว่าการใช้แบคทีเรียที่ตัดต่อพันธุกรรมในการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักย่อยในกระเพาะรูเมนนั้นอาจมีการกระจายของยีนที่ต่อต้านสารปฏิชีวนะที่ใช้เป็น Marker gene ในการตัดต่อพันธุกรรมของแบคทีเรียไปยังสิ่งแวดล้อมหรือแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่ก่อโรคชนิดต่างๆ ซึ่งอาจเป็นผลร้ายที่จะเกิดต่อระบบนิเวศน์ในกระเพาะรูเมนและต่อมนุษย์ได้

McSweeney และคณะ (1999) รายงานเกี่ยวกับการคัดเลือกเชื้อราเส้นใยสีขาว (White rot fungi) ในธรรมชาติในประเทศออสเตรเลีย จำนวน 10 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายลิกนินของชานอ้อยในสารละลายรูเมน ในหลอดทดลอง พบว่าเชื้อราเส้นใยสีขาวส่วนใหญ่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยลดลง แต่อย่างไรก็ตาม มีหลายสายพันธุ์ที่สามารถย่อยลิกนินได้ ซึ่งอาจพัฒนามาใช้ในการเพิ่มความสามารถในการหมักย่อยคาร์โบไฮเดรตชนิดโครงสร้างในกระเพาะรูเมนได้อนาคต

Jones และ Megarrity (1986) กล่าวถึงการใช้แบคทีเรีย *Synergistes jonesii* ที่สามารถย่อยสารพิษไมโมซินในพืชตระกูลกระถิน (*Leucaena leucocephala*) ที่แยกได้จากกระเพาะรูเมนของแพะสายพันธุ์ฮาวาย นำมาปลูกถ่ายเชื้อลงในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องชนิดอื่น พบว่าสัตว์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สามารถทนต่อพิษของสารประกอบ 3-hydroxy-4(1H)-pyridone; DHP ซึ่งเป็นสารประกอบอะมิโนที่ไม่ใช่โปรตีนที่เปลี่ยนมาจากไมโมซินในกระถินได้

Wallace และ Newbold (n.d.) รายงานว่าการใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae, Lactobacillus spp., Streptococcus faecium,* และ *Aspergillus oryzyae* เสริมในอาหารให้ลูกโคและลูกแกะ สามารถที่จะเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและกระตุ้นการพัฒนาของกระเพาะรูเมนในลูกสัตว์ และเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเมื่อสัตว์โตเต็มวัย เช่นเดียวกับ Durand และ Fonty (2001) ที่รายงานว่าการใช้ *S. cerevisiae* CNCM I-1077 ปลูกถ่ายลงในกระเพาะรูเมนของลูกแกะ พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการหมักย่อยในกระเพาะรูเมนได้เมื่อลูกแกะโตขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักย่อยของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมน และมีความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยง่ายสูงกว่าเมื่อเทียบกับแกะกลุ่มที่ไม่ได้ทำการปลูกถ่ายยีสต์ชนิดนี้ให้

Kung (n.d.) รายงานไว้เช่นเดียวกันว่าการใช้ *S. cerevisiae* และ *A. oryzyae* ให้กับสัตว์โดยตรง (Direct Fed Microbial; DFM) จะช่วยควบคุมสมดุลของ pH ในกระเพาะรูเมน และช่วยให้ *S. ruminantium* สามารถใช้แลคเตทได้ดีขึ้น ซึ่งยังเป็นการเพิ่มศักยภาพการหมักย่อยสลายเยื่อใยของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Nisbet และ Martin (1990) ที่รายงานว่า *A. oryzyae* มีความสามารถสามารถที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ของแลคเตทของ *S. ruminantium* ได้ ทำให้ผลผลิตของโพรพิโอเนทเพิ่มขึ้น และลดสัดส่วนของอะซิเตทต่อโพรพิเนทลง

นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์ที่คัดเลือกจากสัตว์ หรือจากสิ่งแวดล้อมอื่นอีกหลายชนิดเพื่อนำมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักย่อยในกระเพาะรูเมนของสัตว์ หรือเพิ่มสมรรถภาพการผลิตของสัตว์ (Kung, n.d.; Wallace and Newbold, n.d.) ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเยื่อใยได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยคุณภาพต่ำได้ดี ที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือที่ได้รับฟางข้าวนั้น จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะทำให้ได้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยคุณภาพต่ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่ในอนาคตจะสามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักย่อย หรือสามารถใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ที่แบคทีเรียผลิต มาปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักย่อยในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องในการผลิตปศุสัตว์ได้ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

การทดลองที่ 1 การคัดเลือกแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายเยื่อใยจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใย

1.1 สัตว์ทดลองและการจัดการ

กระบือปลักโตเต็มวัย เพศเมีย จำนวน 4 ตัว ที่เจาะกระเพาะรูเมน เลี้ยงในคอกขังเดี่ยว (2.5×4 ตารางเมตร) ทำการแบ่งกระบือออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 2 ตัว กระบือกลุ่มแรกได้รับอาหารหยาบคุณภาพต่ำ (ฟางข้าว) และกระบือกลุ่มที่สองได้รับหญ้าขนสด กระบือทั้งสองกลุ่มจะได้รับอาหารหยาบ น้ำดื่มที่สะอาดและแร่ธาตุก้อนอย่างเต็มที่ จากนั้นให้สัตว์ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลานานประมาณ 3 เดือน เพื่อให้จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนได้มีการปรับตัวให้เข้ากับอาหารที่สัตว์กินเข้าไปอย่างดีที่สุด

1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1) เครื่องอุ่นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Electrically heated quartz-reacted column) ที่มีเม็ดทองแดงบรรจุในหลอดแก้ว เผาให้ร้อนที่อุณหภูมิ 350 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการจับแก๊สออกซิเจนและทำให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์บริสุทธิ์

2) อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำอาหารวุ้นแบบ Roll tube (SANSHIN Roll Tube Anaeobic Cultue system)

3) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4) ตู้ปลอดเชื้อ (Lamina flow)

5) อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับเขี่ยเชื้อ

6) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

7) หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

1.3 สารละลายและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3.1 สารละลายทำเจือจาง (Dilution Solution) ตามวิธีของ สุริยะ และ Kobayashi (2550) ดังนี้

1) สารละลายแร่ธาตุชนิดที่ 1 (0.6 กรัม K_2HPO_4 ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)	7.5	มิลลิลิตร
2) สารละลายแร่ธาตุชนิดที่ 2 (1.2 กรัม NaCl, 1.2 กรัม $(NH_4)_2SO_4$, 0.6 กรัม KH_2PO_4, 0.12 กรัม $CaCl_2$, 0.25 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร)	7.5	มิลลิลิตร
3) L-cysteine-HCL•H_2O	0.05	กรัม
4) Na_2CO_3	0.3	กรัม
5) 0.1% Resazurin	0.1	มิลลิลิตร
6) น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เติมสารลายในลำดับที่ 1 - 6 จากนั้นนำไปต้ม ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เพื่อไล่ออกซิเจนออกจากสารละลาย แล้วนำมาไล่ออกซิเจนโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จนกระทั่งปราศจากออกซิเจน (เปลี่ยนจากสีชมพูเป็นไม่มีสี) และปิดฝาให้สนิท ก่อนที่จะนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน (Basal broth medium) ตามวิธีของ สุริยะ และ Kobayashi (2550) ดังนี้

1) สารละลายแร่ธาตุชนิดที่ 1	7.5	มิลลิลิตร
2) สารละลายแร่ธาตุชนิดที่ 2	7.5	มิลลิลิตร
3) L-cysteine-HCl•H_2O	0.1	กรัม
4) 0.1% resazurin	0.1	มิลลิลิตร
5) Bactopeptone	0.2	กรัม
6) Yeast extracts	0.12	กรัม
7) Rumen fluid	30	มิลลิลิตร
8) น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร
9) สารละลาย 8% Na_2CO_3	5	มิลลิลิตร

การปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำการปรับหลังจากละลายสารในลำดับที่ 1 - 8 เข้าด้วยกันแล้วปรับความเป็นกรด-ด่างได้ตามที่ต้องการ (6.8) แล้วเติมสารละลายในลำดับที่ 9 จากนั้นนำไปต้ม ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เพื่อไล่ออกซิเจนออกจากอาหาร แล้วไล่ออกซิเจนในอาหารอีกครั้งโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จนกระทั่งปราศจากออกซิเจน และปิดฝาให้สนิท ก่อนที่จะนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 0.2 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสและเซลโลไบโอส เป็นแหล่งคาร์บอน (Rumen fluid glucose cellobiose medium; RGC)

1) สารละลายแร่ธาตุชนิดที่ 1	7.5	มิลลิลิตร
2) สารละลายแร่ธาตุชนิดที่ 2	7.5	มิลลิลิตร
3) L-cysteine-HCl•H_2O	0.1	กรัม
4) 0.1% resazurin	0.1	มิลลิลิตร
5) Bactopeptone	0.2	กรัม
6) Yeast extracts	0.12	กรัม
7) Rumen fluid	30	มิลลิลิตร
8) Glucose	0.1	กรัม
9) Cellobiose	0.1	กรัม
10) น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร
11) สารละลาย 8% Na_2CO_3	5	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การปรับความกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำการปรับหลังจากละลายสารในลำดับที่ 1 - 10 เข้าด้วยกันแล้วปรับความกรด-ด่างตามที่ต้องการ (6.8) แล้วเติมสารลายในลำดับที่ 11 จากนั้นนำไปต้ม ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที เพื่อไล่ออกซิเจนออกจากอาหาร แล้วไล่ออกซิเจนในอาหารอีกครั้งโดยใช้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จนกระทั่งปราศจากออกซิเจน และปิดฝาให้สนิท ก่อนที่จะนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สำหรับการเตรียมอาหารวุ้นแบบ Roll tube (Rumen fluid glucose cellobiose agar medium; RGCA) ทำโดยการชั่ง agar น้ำหนัก 0.2 กรัม ใส่ในหลอดก่อนการเติมสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อลงในหลอด แล้วผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2. การวัดความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยฟางข้าวของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ (Rice straw digestibility)

2.1 การเตรียมเยื่อใยที่ใช้ในการทดสอบ

ฟางข้าว (RS) บดผ่านตะแกรงขนาด 2.0 มิลลิเมตร และนำไปต้มในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง ทำหลายๆ รอบจนน้ำที่กรองได้ใส แล้วนำไปอบจนแห้ง

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1) ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส
2) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge; HERMLE Z200A, Germany)
3) เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอล (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

2.3 สารละลายและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 0.2 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสและเซลโลไบโอส เป็นแหล่งคาร์บอน (Rumen fluid glucose cellobiose medium; RGC) ใช้ในการเจริญ (Re-growth) เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 1 ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน

3) สารละลายเจือจาง ใช้ในการเจือจางเชื้อแบคทีเรียเพื่อทำการปลูกถ่ายลงในอาหารทดลอง

3. การบ่งชี่อเชื้อแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย

3.1 การบ่งชี่อเชื้อด้วยวิธีแบบดั้งเดิม

3.1.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1) สารเคมีสำหรับการย้อมติดสีแกรม (Gram's stain) (Crytal violet, Gram iodine, Decolorize (Acetone alcohol), Safranin)

2) กล้องจุลทรรศน์ (Compound microscope)

3) กลีเซอรอล (Glyceral)

4) อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันที่ระเหยง่าย ได้แก่ กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดบิวทิริก และกรดวาเลอริก ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC-9A; Shimadzu, Japan)

3.2 การบ่งชี่อเชื้อด้วยวิธีการทางด้านชีวโมเลกุล

3.2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1) อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ของแบคทีเรียด้วยวิธีการต้มในน้ำเดือด

2) อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (16S rDNA Polymerase chain reaction; PCR) ด้วยเครื่อง Multi Gene gradient thermal cycle (Labnet endure ™, USA)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3) อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลผลิตของ PCR ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis (Mini-Plus Horizontal Gel Electrophoresis; Labnet endro™, USA)

4) อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดชิ้นส่วนของ DNA จากเจล โดยใช้ OIAEK II Gel Extraction Kit (Invitrogen PureLink™, QIAGEN K.K., Japan)

5) อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการคัดลอกดีเอ็นเอเข้าไปใน pTZ57R/T Plasmid vector แล้วนำเข้าสู่เซลล์ให้อาศัย (Transfomation) ของ *E. coli* HIT-JM109 และการตรวจสอบดีเอ็นเอลูกผสม (Plasmid) ตามวิธีการและคำแนะนำของ InsTAclone™ PCR Cloning Kit

6) อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิด (Blue-White selection) และทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Quick Plasmid Miniprep kit (Invitrogen PureLink™, QIAGEN K.K., Japan)

7) อุปกรณ์ที่ใช้ในการถ่ายภาพเจล ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล(Gel documentation, DNr Bio-Imaging System, MiniBIS Pro)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดลองที่ 2 การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกมาได้ในหลอดทดลอง (*In vitro* study)

แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

1. การวัดความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของเชื้อบริสุทธิ์

1.1 การเตรียมเยื่อใยที่ใช้ในการทดสอบ

เยื่อใยที่ใช้ในการทดสอบ ประกอบด้วย เซลลูโลสบริสุทธิ์ (CP; Sigmacell 20; Sigma®) ฟางข้าว และหญ้าขน (PG) โดยฟางข้าวหรือหญ้าขนเตรียมได้โดยการบดผ่านตะแกรงขนาด 2.0 มิลลิเมตร และนำไปต้มในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง ทำหลายๆ รอบจนน้ำที่กรองได้ใส แล้วนำไปอบจนแห้ง

1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1) ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส
2) เครื่องปั่นเหวี่ยง
3) เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอล (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

1.3 สารละลายและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 0.2 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสและเซลโลไบโอส เป็นแหล่งคาร์บอนใช้ในการเจริญเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 1 ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน

3) สารละลายทำเจือจาง ใช้ในการเจือจางเชื้อแบคทีเรียเพื่อทำการปลูกถ่ายลงในอาหารทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใย (Cellulase และ Xylanase)

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1) ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส

2) เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบอุณหภูมิ (Thermal control Centrifuge; Universal 320R, Hettich zentrifugen, Germany)

3) เครื่องทำให้เซลล์แตกด้วยคลื่นเสียงความถี่สูง (Ultrasonic sonicator; UD-201, TOMY, Japan)

4) อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าความยาวคลื่นแสงด้วยเครื่องวัดค่าความยาวคลื่นแสง (Spectrophotometer; Spectromic genesys 5)

2.2 สารละลายและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 0.2 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสและเซลโลไบโอส เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ในการเจริญเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 1 ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2) สารละลาย 50 mM Phosphate buffer (pH 6.8)

3) สารละลาย Carboxyl methyl-cellulose (1% CMC in streized 50 mM phosphate buffer; Sigma)

4) สารละลายมาตรฐาน 20 mM D-glucose

5) สารละลาย Xylan (1% Xylan in streized 50 mM phosphate buffer; Sigma)

6) สารละลายมาตรฐาน 20 mM D-Xylose

7) สารละลาย DNS (3.5-dinitrosalicilic acid mw = 228.12)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การวัดความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใย (Adhesion ability)

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1) เยื่อใยที่ใช้ในการทดสอบ ประกอบด้วย เซลลูโลสบริสุทธิ์ ฟางข้าว และหญ้าขน

2) อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าการส่องผ่านของแสง ด้วยเครื่องวัดค่าการส่องผ่านของแสง (Optical density; OD_{660}, Amersham Bioscience)

3) ตู้บ่มเชื้อ

3.2 สารละลายและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 0.2 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสและเซลโลไบโอส เป็นแหล่งคาร์บอนใช้ในการเจริญ เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 1 ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2) สารละลายทำเจือจาง ใช้ในการเจือจางเชื้อแบคทีเรียเพื่อทำการปลูกถ่ายลงในอาหารทดลอง

4. วัดความสามารถในการผลิตแก๊ส (Gas production)

4.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1) อุปกรณ์ที่ใช้ในการวัดค่าการผลิตแก๊ส ด้วยเครื่องวัดค่าการผลิตแก๊ส (ANKOM^{RF} Gas Production System, USA)

2) อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน

3) ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Shake incubater; Visoin Green SSeriker II, Scientific, co. Ltd, South Korea)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2 สารละลายและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 0.2 เปอร์เซ็นต์ กลูโคสและเซลโลไบโอส เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ในการเจริญเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 1 ซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2) สารละลายทำเจือจาง ใช้ในการเจือจางเชื้อแบคทีเรียเพื่อทำการปลูกถ่าย

วิธีการ

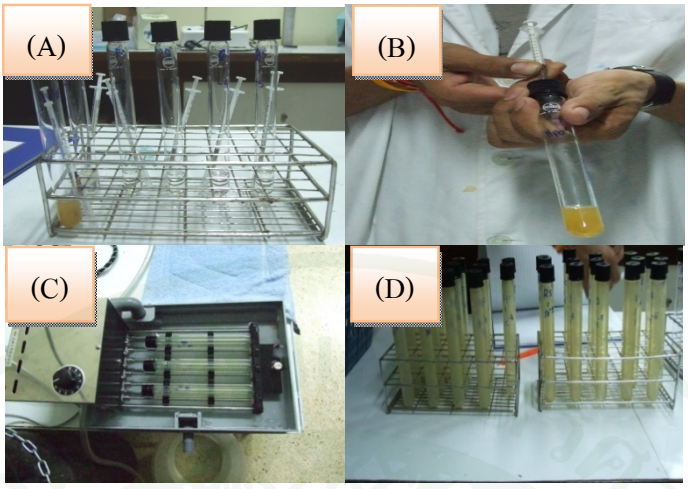
การทดลองที่ 1 การคัดเลือกแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายเยื่อใยจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

1. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใย

1.1 การส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย ใช้ฟางข้าวหรือหญ้าขนสดใส่ในถุงไนลอนแล้วนำไปแช่ในกระเพาะรูเมนของกระบือที่ได้รับฟางข้าวหรือหญ้าขนสด เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมง จากนั้นนำฟางข้าวหรือหญ้าขนดังกล่าวมาล้างในสารละลายทำเจือจางภายใต้สภาวะปลอดออกซิเจน (Ogimoto and Imai, 1981) 1 ครั้ง นาน 1 นาที เพื่อให้เหลือเฉพาะจุลินทรีย์ที่ยึดเกาะอยู่บนเยื่อใยเท่านั้น แล้วนำชิ้นส่วนที่ผ่านการล้างแล้ว ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman®) ขนาด 0.5 × 1.0 ตารางเซนติเมตร จำนวน 2 แผ่น เป็นแหล่งของคาร์บอนในสูตรอาหารพื้นฐาน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จนกระทั่งกระดาษกรองถูกย่อย

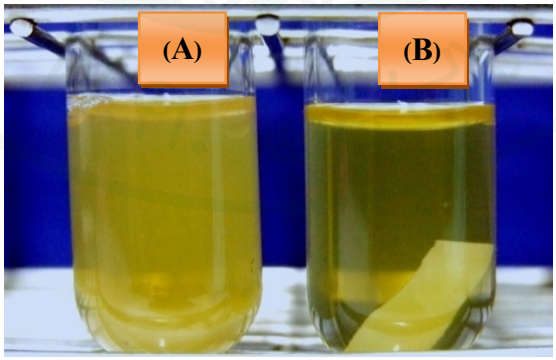
1.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยบริสุทธิ์ นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งของคาร์บอน มาทำการเจือจางในสารละลายทำเจือจางภายใต้สภาวะปลอดออกซิเจน (ที่ระดับการเจือจาง 10^{-4} ถึง 10^{-6}) แล้วนำตัวอย่างเชื้อที่เจือจาง (0.2 มิลลิลตร) มาทำการปลูกถ่ายลงในอาหารวุ้น ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส และ เซลโลไบโอส เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้วิธีการ Roll tube (ภาพที่ 6) (Ogimoto and Imai, 1981) จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 72 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งสามารถมองเห็นโคโลนีของจุลิทรีย์เจริญบนอาหารวุ้น ทำการแยกเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 ขั้นตอนการปลูกถ่ายเชื้อลงในอาหารวุ้นโดยใช้วิธีการ Roll tube โดยที่ A คือ การเจือจางเชื้อ, B คือ การปลูกถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหารวุ้น, C คือ การทำให้อาหารวุ้นแข็งตัวเคลือบผิวหลอด และ D คือ หลอดอาหารวุ้นที่พร้อมนำไปบ่มเชื้อ

1.3 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเยื่อใย นำเชื้อที่แยกจากอาหารวุ้นไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีกระดาษกรองเบอร์ 1 เป็นแหล่งของคาร์บอน จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3-5 วัน และทำการคัดเลือกเอาเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยกระดาษกรองได้เท่านั้น (ภาพที่ 7) ทำการย้อมติดสีและศึกษาลักษณะรูปร่างภายนอกด้วยกล้องจุลทรรศน์ แล้วเก็บเชื้อเหล่านี้ไว้ใน กลีเซอรอล 15 เปอร์เซ็นต์ หรือในอาหารวุ้น RGCA (2% agar) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 7 กระดาษกรองที่ถูกย่อยโดยแบคทีเรีย (A) กระดาษกรองที่ไม่ถูกย่อยโดยแบคทีเรีย (B)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การวัดความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยฟางข้าวของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

การวัดความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวเชื้อบริสุทธิ์แต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาได้ โดยวิธีการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวของแบคทีเรียใช้วิธีการของ Sawanon และ Kobayashi (2006) ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.1 ชั่งเยื่อใยของฟางข้าวที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ประมาณ 0.1 กรัม แล้วอบที่ 100 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ ใส่ในหลอดเลี้ยงเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วเติมอาหารสูตรพื้นฐานที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนอื่นอยู่เลย ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.2 ทำการปลูกถ่ายเชื้อ แบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงไป หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร โดยวิธีการเตรียมคือให้แบคทีเรียที่เจริญในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอน (0.1% w/v) คือ กลูโคสและเซลโลไบโอส โดยบ่มเชื้อที่ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง (Log phase) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,800×g นาน 10 นาที ดูดส่วนของเหลวออก (เก็บของเหลว 1.5 มิลลิลตร เพื่อวิเคราะห์กรดไขมันที่ระเหยง่าย) แล้วเจือจางด้วย สารละลายทำเจือจาง 1.0 มิลลิลิตร

2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 2,800×g นาน 15 นาที แล้วดูดเอาส่วนของเหลวทิ้ง นำตะกอนที่อยู่ในหลอดทดลองไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส จนกว่าชั่งได้น้ำหนักคงที่

2.4 ขณะเดียวกันก็ทำ Blank เพื่อใช้เปรียบเทียบ โดยทำทุกขั้นตอนเหมือนกัน แต่ไม่มีการปลูกถ่ายเชื้อลงไป แต่จะนำไปปั่นเหวี่ยงและอบเพื่อชั่งน้ำหนักเลยทันที และคำนวณความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใย

สูตรคำนวณ: ความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใย (%DM) = $[(A-B)]/A \times 100$

A = น้ำหนักวัตถุแห้งของเยื่อใยก่อนถูกย่อย

B = น้ำหนักวัตถุแห้งของเยื่อใยหลังถูกย่อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การบ่งชี้เชื้อแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย

3.1 การบ่งชี้เชื้อด้วยวิธีแบบดั้งเดิม โดยศึกษาการย้อมติดสีแกรม รูปร่าง การเรียงตัวของเซลล์ และการผลิตกรดไขมันที่ระเหยง่ายที่แบคทีเรียผลิตได้ โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography (GC-9A) ตามวิธีการของ Sawanon (2003)

3.2 การบ่งชี้เชื้อด้วยวิธีการทางด้านชีวโมเลกุลของแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกมา โดยการหาลำดับเบสบางส่วนของ 16S rDNA (Sawanon *et al.*, 2003) โดยมีขั้นตอนพอสังเขปดังนี้

1) การสกัด DNA ของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ โดยการนำแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตกตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000×g นาน 1 นาที จากนั้นเติม TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำให้เซลล์แตกโดยการต้ม นาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000×g นาน 5 นาที เก็บส่วนของเหลวซึ่งเป็นสารละลาย DNA ไว้ (ที่ -20 องศาเซลเซียส) จากนั้นนำสารละลาย DNA ที่ได้ มาทำการเพิ่มชิ้นส่วนของ 16S rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ดังนี้

530-Universal forward primer (5’ GTGCCAGCMGCCGCGG 3’; M= A+C Wobble)
1392-Universal reverse primer (5’ ACGGGCGGTGTGTRC 3’; R= G+A Wobble)

กระบวนการทำ PCR ประกอบด้วย

ส่วนประกอบของสารละลาย PCR

PCR mixture (Go Taq, 2x)	10	ไมโครลิตร
530 Universal forward primer (10 pmol/ml)	1	ไมโครลิตร
1392-Universal reverse primer (10 pmol/ml)	1	ไมโครลิตร
DNA template	1	ไมโครลิตร
Distilled H_2O	7	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20	ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปฏิกิริยาเกิดในเครื่อง Multi Gene gradient thermal cycle (Labnet, USA) ภายใต้ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ดังนี้

รอบที่ 1	Denaturation	94	องศาเซลเซียส	นาน	8	นาที
	Annealing	58	องศาเซลเซียส	นาน	45	วินาที
	Extension	72	องศาเซลเซียส	นาน	1	นาที
รอบที่ 2–47	Denaturation	94	องศาเซลเซียส	นาน	30	วินาที
	Annealing	58	องศาเซลเซียส	นาน	45	วินาที
	Extension	72	องศาเซลเซียส	นาน	1	นาที
รอบที่ 48	Denaturing	94	องศาเซลเซียส	นาน	30	วินาที
	Annealing	58	องศาเซลเซียส	นาน	45	วินาที
	Extension	72	องศาเซลเซียส	นาน	6	นาที

ทำการวิเคราะห์ผลผลิตของ PCR ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis (Mini-Plus Horizontal Gel Electrophoresis; Labnet) และทำการสกัดเอาชิ้นส่วนของ DNA ที่มีขนาดประมาณ 900 bp โดยใช้ OIAEK II Gel Extraction Kit

2) จากนั้นนำชิ้นส่วน DNA ที่ได้มาโคลนเข้าไปใน pTZ57R/T Plasmid vector (InsTAclone™ PCR Cloning Kit) แล้วนำเข้าสู่เซลล์ให้อาศัยหรือการทรานส์ฟอร์เมชั่น (Transfomation) ของ *E. coli* HIT-JM109 จากนั้นนำเอา *E. coli* ที่ผ่านการทรานส์ฟอร์เมชั่นมาเลี้ยงในอาหารวุ้น LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน แล้วบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3) ทำการสกัดพลาสมิด โดยการเลือกโคโลนีสีขาว (Blue-White selection) และทำให้บริสุทธิ์ ตามวิธีการที่แนะนำใน Quick Plasmid Miniprep kit

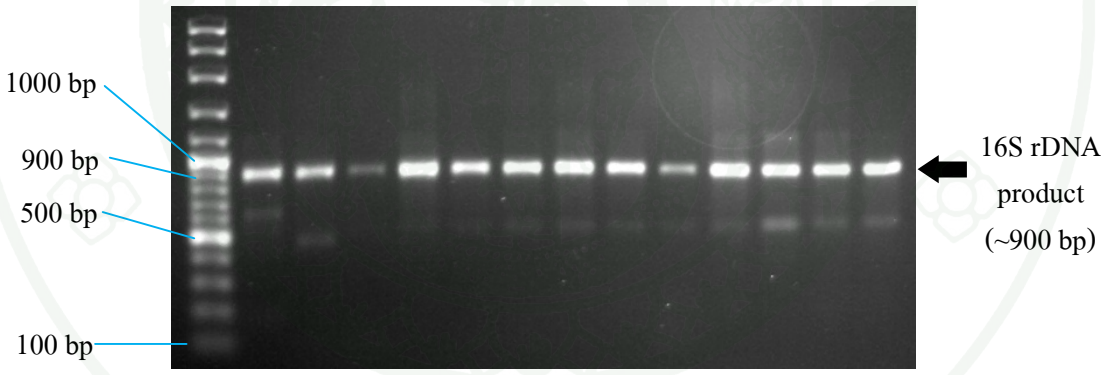
4) ทำการตรวจสอบหาดีเอ็นเอเป้าหมายในดีเอ็นลูกผสม (พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย คือ 16S rDNA ที่มีความยาวประมาณ 900 คู่เบสเชื่อมต่ออยู่ ดังแสดงในภาพที่ 8) โดยใช้วิธีการ PCR ตามวิธีการที่แนะนำ ใน (InsTAclone™ PCR Cloning Kit)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5) นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับเบสของ 16S rDNA (16S rDNA sequence) (FIRST BASE LABORATORIES SDN BH, Malasia) และเมื่อได้ลำดับเบสของ Forward และ Reverse แล้วนำมาเปรียบเทียบความถูกต้องโดยใช้โปรแกรม Sequence scanner Version 1.0 ((FIRST BASE LABORATORIES SDN BH, Malasia)

6) นำลำดับเบส 16S rDNA ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA แบคทีเรียที่ทราบชนิดใน GenBank (BLAST N, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) จะทำให้ทราบว่าแบคทีเรียที่แยกได้นั้นมีลำดับเบสของ 16S rDNA ใกล้เคียงกับแบคทีเรียชนิดใดมากที่สุด

7) จากนั้นคัดเลือกเอาลำดับเบสของ 16S rDNA แบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่อยู่ใน GenBank มาทำการ Multialigment และ Phylogentic analysis โดยใช้โปรแกรม Clustal X 1.83 (Chenna *et al.* 2003) และทำการเขียนแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม NJPLOT (Perrière and Gouy, 1996) โดยให้ค่า Bootstrap trails = 1,000



ภาพที่ 8 การแยกชิ้นส่วน 16S rDNA โดยวิธี Agarose gel electrophoresis (~900 bp)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดลองที่ 2 การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกมาได้ในหลอดทดลอง (*In vitro* study)

การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่คัดเลือกมาได้ ในหลอดทดลอง เพื่อศึกษาศักยภาพในการย่อยสลายอาหารหยาบ โดยนำแบคทีเรียที่คัดเลือกมาได้ ที่มีคุณสมบัติเบื้องต้นเกี่ยวกับการย่อยสลายเยื่อใยได้ดี เพื่อศึกษาถึงศักยภาพในด้านต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหารหยาบ ดังนี้

1. การวัดความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของเชื้อบริสุทธิ์

การวัดความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของเชื้อบริสุทธิ์แต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาได้ โดยวิธีการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของเซลลูโลสบริสุทธิ์ ฟางข้าว และหญ้าขน ของแบคทีเรียใช้วิธีการของ Sawanon และ Kobayashi (2006) โดยมีขั้นตอนเหมือนการทดลองที่ 1

2. ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใย

2.1 วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ Cellulase และ Xylanase ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย (Intracellular activity) มีขั้นตอนดังนี้

1) แบคทีเรียเจริญในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอน (0.25%w/v) คือ กลูโคสและเซลโลไบโอส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่ 38°C เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง

2) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,800×g นาน 10 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นของเหลวและตะกอนของแบคทีเรียออกจากกัน กำจัดน้ำตาลที่มาจากอาหารเลี้ยงเชื้อโดยล้างด้วยสารละลาย 50 mM Phosphate buffer (pH 6.8) 2 มิลลิลิตร 2 ครั้ง

3) นำตะกอนแบคทีเรียมาเติมด้วยสารละลาย 50 mM Phosphate buffer (pH 6.8) 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultrasonic (UD-201, TOMY, Japan) ภายใต้อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 20,000×g นาน 10 นาที เพื่อแยกเอาสารละลายไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย (Kobayashi *et al.,* 1998; Sawanon *et al.* 2003)

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ใช้ Carboxyl methyl-cellulose (1% CMC in streized 50 mM phosphate buffer) เป็นสารละลายตั้งต้น และใช้ 20 mM D-glucose เป็นสารละลายมาตรฐาน การวัดปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลส ทำการวัดภายใต้สภาวะดังนี้ 0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายเอนไซม์ และ 0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายตั้งต้นใน 50 mM Phosphate buffer ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้ววัดปริมาณ D-glucose ที่ถูกปลดปล่อยออกมา เปรียบกับ D-glucose มาตรฐาน ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ตามวิธีของ Miller (1959)

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสใช้วิธีการเดียวกับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส แต่จะใช้ Xylan (1% Xylan in streized 50 mM phosphate buffer) เป็นสารละลายตั้งต้น และใช้ 20 mM D-Xylose เป็นสารละลายมาตรฐาน

3. การวัดความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใย (Adhesion ability)

การวัดความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใย โดยเยื่อใยที่จะใช้ทดสอบ ประกอบด้วย ผงเซลลูโลส ฟางข้าว และหญ้าขนที่บดผ่านตะแกรงขนาด 0.2 มิลลิเมตร สำหรับการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยึดเกาะกับเยื่อใย ใช้วิธีของ Sawanon และคณะ (2003) ทำตัวอย่างละ 4 ซ้ำ โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.1 แบคทีเรียเจริญในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอน (0.25% w/v) คือ กลูโคสและเซลโลไบโอส โดยบ่มเชื้อที่ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดค่าความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น (Optical density; OD_{660})

3.2 ทำการย้ายแบคทีเรียที่ทราบค่า $OD_{เริ่มต้น}$ ใส่ในหลอดที่มีเยื่อใยชนิดต่างๆ อยู่ (ทำในสภาวะปราศจากออกซิเจน) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 38 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 นำเชื้อที่ผ่านการบ่มแล้วมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่มีรูขนาด 20-30 ไมโครเมตร นำของเหลวที่ผ่านการกรองไปวัดค่า $OD_{หลัง}$ (เป็นความหนาแน่นของเซลล์ที่ไม่ได้ยึดเกาะบนเยื่อใย)

3.4 ขณะเดียวกันก็ทำ Blank เพื่อนำมาใช้ในการเปรียบเทียบ โดยทำทุกขั้นตอนเหมือนกัน แต่ต่างกันที่ ใน Blank จะไม่มีเยื่อใยหรือเซลล์ของแบคทีเรียอยู่ด้วย

สูตรคำนวณ: ความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใย (%) = $[(OD_{เริ่มต้น} - OD_{หลัง})/ OD_{เริ่มต้น}]\times 100$

$OD_{เริ่มต้น}$ = ค่าความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นก่อนการบ่มเชื้อ

$OD_{หลัง}$ = ค่าความหนาแน่นของเซลล์หลังการบ่มเชื้อ 30 นาที

4. วัดความสามารถในการผลิตแก๊ส (Gas production)

โดยใช้วิธีการวัดการผลิตแก๊สตามวิธีการของ ANKOM^{RF} Gas Production System, USA

4.1 แบคทีเรียเจริญในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอน (0.2% w/v) คือ กลูโคสและเซลโลไบโอส ในหลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร สายพันธุ์ละ 5 หลอด โดยบ่มเชื้อที่ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง

4.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,800×g นาน 10 นาที จากนั้นดูดส่วนของเหลวออก ละลายตะกอนด้วย สารละลายทำเจือจาง 1.0 มิลลิลิตรต่อหลอด แล้วนำมารวมในหลอดเดียวกัน (ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน) ได้เชื้อแบคทีเรียพร้อมสำหรับทำการปลูกถ่ายลงในขวดใส่อุปกรณ์วัดค่าการผลิตแก๊ส

4.3 การเตรียมอุปกรณ์วัดค่าการผลิตแก๊ส

1) ชั่ง Cellulose powder 2 กรัม ใส่ในขวดปฏิกิริยา (Reactor; ปริมาตร 250 มิลลิลิตร) ของอุปกรณ์ค่าการผลิตแก๊ส (ทำตัวอย่างละ 4 ซ้ำ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2) เติมอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน 200 มิลลิลิตรต่อ 1 ขวดปฏิกิริยา ใส่ในขวดปฏิกิริยา จากข้อ 1 (ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน)

3) ทำการปลูกถ่ายเชื้อ จากข้อ 4.2 ลงในขวดปฏิกิริยา 1 มิลลิลิตรต่อขวด ปิดด้วยฝาของขวดปฏิกิริยาให้สนิท (ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน)

4) บ่มเชื้อที่ 38 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยตั้งโปรแกรมการบันทึกข้อมูลค่าความดันจากการผลิตแก๊สทุกๆ 1 ชั่วโมง

5) ทำ Blank ด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 1 – 4 แต่ไม่มีการปลูกถ่ายเชื้อลงในขวดปฏิกิริยา

6) นำค่าความดันจากการผลิตแก๊สที่บันทึกด้วยโปรแกรมของ ANKOM^{RF} Gas Production System ไปคำนวณหาปริมาตรแก๊สที่ผลิตได้ด้วยสูตร:

$$V_x = V_j P_{psi} \times 0.068004084$$

V_x = ปริมาตรแก๊สที่ผลิต เมื่อบ่มเชื้อที่ 38 องศาเซลเซียส (มิลลิลิตร)

V_j = ปริมาตรที่เหลือของ Reacter หลังการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ (มิลลิลิตร)

P_{psi} = ค่าความดันที่บันทึกด้วยโปรแกรม ANKOM^{RF} Gas Production System, USA (กิโลปาสคาล)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การคัดเลือกแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายเยื่อใย จากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย

การคัดเลือกแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยจากกระเพาะรูเมนกระบือ ทำการแยกเชื้อจากแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 1,363 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 2 พบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยจำนวน 223 ไอโซเลท คิดเป็น 16.36 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกทั้งหมด เมื่อทำการศึกษาการย้อมติดสีแกรมและรูปร่างของเซลล์ พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดมีโคโลนีสีขาว เซลล์ย้อมติดสีแกรมลบที่มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เชื้อแบคทีเรียจากกระบือที่ได้รับฟางข้าวทั้งหมด 813 ไอโซเลท พบแบคทีเรียที่ย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวได้ดี 86 ไอโซเลท คิดเป็น 10.57 เปอร์เซ็นต์ เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกจากกระบือที่ได้รับหญ้าขนสดทั้งหมด 550 ไอโซ-เลท พบแบคทีเรียที่ย่อยสลายเยื่อใยของหญ้าขนสดได้ดี 137 ไอโซเลท คิดเป็น 24.90 เปอร์เซ็นต์

แบคทีเรียทั้ง 223 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียที่ยึดเกาะอยู่บนส่วนของเยื่อใยของฟางข้าวหรือหญ้าขนสดที่ใส่ถุงไนลอนแล้วนำไปแช่ในกระเพาะรูเมน ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์กับอาหารที่แบคทีเรียเข้ายึดเกาะ (แบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย) เนื่องจากในขั้นตอนของการเก็บตัวอย่างนั้นได้มีการล้างเยื่อใยของฟางข้าวหรือหญ้าขนสดด้วยสารละลายทำเจือจางก่อนที่จะทำการปลูกถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียที่พบอาจจะไม่ใช่แบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยทั้งหมด ซึ่งอาจเป็นแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่ยึดเกาะอยู่บนเยื่อใย (สุริยะ, 2551; Koike *et al.* 2003; Sun *et al.*, 2008) แบคทีเรียในกระเพาะรูเมนมีลักษณะของเซลล์และการย้อมติดสีแกรมที่มีความหลากหลายแม้จะอยู่ในกลุ่มเดียวกันหรือชนิดเดียวกัน แต่ลักษณะของเซลล์หรือการย้อมติดสีแกรมอาจมีความแตกต่างกัน แต่แบคทีเรียที่อยู่ในกระเพาะรูเมนส่วนใหญ่ (70-80%) เป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่พบได้มาก เช่น *F.succinogenes, Ruminococcus* spp. และ *Butyrivibrio fibrisolvens* ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ที่พบแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนลักษณะเซลล์ก็เช่นกัน แบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยส่วนใหญ่มีลักษณะของเซลล์กลม เช่น *Ruminococcus* spp. ในขณะที่ *F.succinogenes* มีลักษณะเซลล์รูปไข่ ซึ่งการมองผ่านกล้องจุลทรรศน์อาจทำให้มองเห็นเป็นลักษณะกลมได้ (สุริยะ, 2551; Ogimoto and Imai, 1981)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดังนั้นในการทดลองนี้ พบว่าลักษณะเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 85 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3) ที่คัดเลือกมานั้นมีรูปร่างกลมหรือรูปไข่และการย้อมติดสีแกรมลบของแบคทีเรียที่ทำการคัดเลือกทั้งหมดนั้นอาจไม่ใช่แบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่พบได้บ่อยทั้งหมด ดังนั้นจะต้องทำการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวแบคทีเรียทั้ง 85 สายพันธุ์ และจะต้องทำการจำแนกโดยใช้ลักษณะอื่นๆ เป็นองค์ประกอบ เช่น การผลิตกรดไขมันที่ระเหยง่าย การบ่งชื่อเชื้อด้วยวิธีการทางด้านชีวโมเลกุล

ตารางที่ 2 จำนวนแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ได้รับฟางข้าวและหญ้าขนสด

Feed	Numbers of bacteria isolation (colony)		
	Total	Fibrolytic	Selection
Rice straw	813	86 (10.57%)	85
Fresh paragrass	550	137 (24.90%)	
Total	**1,363**	**223 (16.36%)**	**85**

ความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยฟางข้าวของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

วัดความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ จำนวน 85 สายพันธุ์ เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยฟางข้าวได้ดี พบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวที่หลากหลาย ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวได้ดีที่สุด 30 สายพันธุ์แรก เมื่อบ่มเชื้อที่ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 3) โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ PG73 มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวได้ดีที่สุด (41.06 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง) และแบคทีเรียสายพันธุ์ PG47 มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวได้ต่ำที่สุด (3.11 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง) ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือที่ได้รับหญ้าขนสด จากตารางที่ 4 จะเห็นว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกมา 85 สายพันธุ์นั้น เป็นแบคทีเรียที่คัดเลือกจากกระบือที่ได้รับฟางข้าว จำนวน 23 สายพันธุ์ คิดเป็น 27.06 เปอร์เซ็นต์ และเป็นแบคทีเรียที่คัดเลือกจากกระบือที่ได้รับหญ้าขนสด จำนวน 62 สายพันธุ์ คิดเป็น 72.94 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกมาส่วนใหญ่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวอยู่ในช่วง 1-10 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง ซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 45 สายพันธุ์ คิดเป็น 52.94 เปอร์เซ็นต์ โดยในจำนวนนี้มาจากกระบือที่ได้รับฟางข้าว จำนวน 7 สายพันธุ์ คิดเป็น 8.24 เปอร์เซ็นต์ และมาจากกระบือที่ได้รับหญ้าขนสด จำนวน 38 สายพันธุ์ คิดเป็น 44.71

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยต่ำ (<1%DM) มีจำนวนทั้งหมด 24 สายพันธุ์ คิดเป็น 28.24 เปอร์เซ็นต์ โดยในจำนวนนี้มาจากกระบือที่ได้รับฟางข้าว จำนวน 4 สายพันธุ์ คิดเป็น 4.17 เปอร์เซ็นต์ และมาจากกระบือที่ได้รับหญ้าขนสด จำนวน 20 สายพันธุ์ คิดเป็น 23.53 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในจำนวนนี้เป็นแบคทีเรีย จำนวน 13 สายพันธุ์ ที่ไม่สามารถย่อยสลาย เยื่อใยของฟางข้าวได้ (0.00 %DM) และอีกกลุ่มคือแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยสูง (>10%DM) มีจำนวนทั้งหมด 16 สายพันธุ์ คิดเป็น 18.82 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่คัดลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือที่ได้รับฟางข้าว มีจำนวน 12 สายพันธุ์ คิดเป็น 14.12 เปอร์เซ็นต์ และจากกระเพาะรูเมนของกระบือที่ได้รับหญ้าขนสด จำนวน 4 สายพันธุ์ คิดเป็น 4.71 เปอร์เซ็นต์

ความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวของเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้ง 85 สายพันธุ์ มีหลากหลาย ซึ่งมีผลมาจากหลายปัจจัย ทั้งจากความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใย ความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ และความจำเพาะต่ออาหาร (เยื่อใย) ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกัน รวมทั้งความสามารถในการใช้ประโยชน์จากเยื่อใย ซึ่งในฟางข้าวมีองค์ประกอบของลิกนินและซิลิกาอยู่สูง ที่มีผลต่อการเข้าย่อยสลายของแบคทีเรีย ปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ล้วนมีผลต่อความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของแบคทีเรีย (สุริยะ, 2551; Chen *et al.,* 2008; Doyle *et al.*, 1986; Jung *et al.*, 1993; Kobayashi, 2000; Van Soest, 2006; Varga and Kolver, 1997) แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ พบแบคทีเรีย 30 สายพันธุ์แรก มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวได้ดี ซึ่งใน 30 สายพันธุ์นี้ มีแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยสูง (>10%DM) รวมทั้งสิ้น 16 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ RS1, RS3, RS4, RS6, RS7, RS9, RS10, RS11, RS12, RS13, RS15, RS16, PG58, PG73, PG75 และ PG85 โดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือที่ได้รับฟางข้าว

จากผลดังกล่าวจะเห็นได้ว่า หากพิจารณาจากลักษณะทางกายภาพ (สัณฐานวิทยาและการย้อมติดสีแกรม) แบคทีเรียที่อยู่ในกระเพาะรูเมนของกระบือ อาจมีลักษณะของเซลล์ที่คล้ายคลึงกัน แต่ผลจากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวแตกต่างกันมาก นั่นแสดงให้เห็นในเบื้องต้นว่า แม้จะเป็นแบคทีเรียกลุ่มดียวกัน แต่ความสามารถในผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยก็อาจมีความแตกต่างกัน (Kobayashi, 2006; Sawanon, 2003) ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 30 สายพันธุ์ จำเป็นต้องได้รับการระบุชื่อด้วยวิธีการทางด้านชีวโมเลกุล จากนั้นทำการศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของหญ้าขน และผงเซลลูโลสบริสุทธิ์ และศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยของแบคทีเรียทั้ง 30 สายพันธุ์ ในการทดลองที่ 2 ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ลักษณะรูปร่างของเซลล์ การย้อมติดสีแกรม และความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยฟางข้าวของแบคทีเรียที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ได้รับฟางข้าวและหญ้าขน

Bacterial strain	Morphology		Digestibility (%)	Bacterial strain	Morphology		Digestibility (%)	Bacterial strain	Morphology		Digestibility (%)
	Shape	Gram's stain			Shape	Gram's stain			Shape	Gram's stain	
RS1*	cocci	-	26.04	PG30	cocci	-	0.30	PG58*	cocci	-	10.31
RS2	cocci	-	0.00	PG31	cocci	-	0.62	PG59*	cocci	-	4.41
RS3*	cocci	-	27.32	PG32	cocci	-	1.91	PG60	cocci	-	0.49
RS4*	cocci	-	33.90	PG33	cocci	-	0.85	PG61	cocci	-	1.43
RS5	cocci	-	2.97	PG34	cocci	-	2.54	PG62	cocci	-	0.00
RS6*	cocci	-	16.97	PG35	cocci	-	2.51	PG63	cocci	-	2.80
RS7*	cocci	-	17.77	PG36*	cocci	-	3.22	PG64	cocci	-	2.93
RS8	cocci	-	0.00	PG37*	cocci	-	3.25	PG65*	cocci	-	3.43
RS9*	cocci	-	17.90	PG38	cocci	-	2.79	PG66	cocci	-	2.85
RS10*	cocci	-	27.77	PG39	cocci	-	2.75	PG67	cocci	-	2.71
RS11*	cocci	-	38.50	RS40	cocci	-	2.13	PG68*	cocci	-	3.22
RS12*	cocci	-	23.14	PG41	cocci	-	2.79	PG69	cocci	-	2.70
RS13*	cocci	-	24.87	PG42	cocci	-	1.62	PG70*	cocci	-	4.44
RS14	cocci	-	0.00	PG43	cocci	-	0.00	PG71*	cocci	-	4.25
RS15*	cocci	-	21.08	PG44	cocci	-	2.77	PG72	cocci	-	2.39
RS16*	cocci	-	16.75	RS45	cocci	-	2.99	PG73*	cocci	-	41.06
RS17	cocci	-	2.79	PG46*	cocci	-	4.06	PG74	cocci	-	0.00
PG18	cocci	-	2.74	PG47*	cocci	-	3.11	PG75*	cocci	-	35.14
PG19	cocci	-	2.64	PG48	cocci	-	1.63	PG76*	cocci	-	8.21
PG20	cocci	-	1.61	PG49	cocci	-	2.43	PG77	cocci	-	0.80
PG21*	cocci	-	7.65	RS50	cocci	-	1.32	PG78*	cocci	-	3.50
RS22	cocci	-	1.91	PG51*	cocci	-	3.31	PG79	cocci	-	0.00
PG23	cocci	-	0.28	PG52	cocci	-	2.23	PG80	cocci	-	1.23
PG24	cocci	-	2.18	PG53*	cocci	-	4.97	PG81	cocci	-	0.62
RS25	cocci	-	0.74	PG54	cocci	-	0.00	PG82	cocci	-	0.08
RS26	cocci	-	1.22	PG55	cocci	-	0.10	PG83	cocci	-	0.00
PG27	cocci	-	0.00	PG56	cocci	-	0.63	PG84	cocci	-	0.00
PG28	cocci	-	0.00	PG57	cocci	-	0.00	PG85*	cocci	-	23.98
PG29	cocci	-	0.85								

หมายเหตุ * แบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวได้ดี หลังบ่มเชื้อที่ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 จำนวนแบคมีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยฟางข้าวในหลอดทดลองที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลักที่ได้รับฟางข้าวและหญ้าขนสดหลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Feed	Digestibility (%DM)			**Total**
	<1	1-10	>10	
Rice straw (%)	4 (4.71)	7 (8.24)	12 (14.12)	**23 (27.06)**
Fresh grass (%)	20 (23.53)	38 (44.71)	4 (4.71)	**62 (72.94)**
Total	**24 (28.24)**	**45 (52.94)**	**16 (18.82)**	**85 (100)**

ผลผลิตกรดไขมันที่ระเหยง่ายของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย

ผลจากการวิเคราะห์ผลผลิตกรดไขมันที่ระเหยง่ายของแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและเซลโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้ง 30 สายพันธุ์ พบผลผลิตส่วนใหญ่เป็น อะซิเตท (C_2) และบิวทิเรท (C_4) ซึ่งเป็นผลผลิตหลักของแบคทีเรียที่ย่อยสลายเยื่อใย แบคทีเรียบางสายพันธุ์มีการผลิตวาเลอเรท (C_5) เล็กน้อย ได้แก่สายพันธุ์ RS15, PG37, RS46 และ PG47 แต่ไม่พบว่ามีสายพันธุ์ใดที่สามารถผลิตโพรพิโอเนท (C_3) ได้ แสดงในตารางที่ 5 แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียสายพันธุ์ RS10, RS11, RS13, PG21, PG51, PG53 และ PG76 วิเคราะห์ไม่พบการผลิตกรดไขมันที่ระเหยง่าย แบคทีเรียบางสายพันธุ์มีการผลิตกรดไขมันที่ระเหยง่ายเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์ RS7 และ PG59 มีการผลิตเฉพาะอะซิเตท แบคทีเรียสายพันธุ์ RS16, PG78 และ PG85 มีการผลิตเฉพาะกรดบิวทิเรท และแบคทีเรียสายพันธุ์ RS46 และ PG47 มีการผลิตเฉพาะวาเลอเรท

สาเหตุที่แบคทีเรียบางสายพันธุ์ไม่สามารถผลิตกรดไขมันที่ระเหยง่าย เป็นไปได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์เหล่านี้ไม่มีการผลิตกรดไขมันที่ระเหยง่าย แต่อาจเป็นกรดชนิดอื่นๆ เช่น ซัคซิเนท หรือฟอร์เมท เป็นต้น จึงไม่สามารถตรวจพบในผลการวิเคราะห์ครั้งนี้ นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตวาเลอเรท (สายพันธุ์ RS15, PG37, RS46 และ PG47) ซึ่งปกติแบคทีเรียที่ผลิตวาเลอเรทมักพบได้ในสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ได้รับอาหารข้นในปริมาณสูง ยกตัวอย่างเช่น *Megasphaera elsdenii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ได้ย่อยสลายเยื่อใยโดยตรง แต่แบคทีเรียกลุ่มนี้ยังคงสามารถย่อยสลายเยื่อใยอยู่ (สุริยะ, 2551; Ogimoto and Imai, 1981; Chen and Weimer, 2001) ดังนั้นในการทดลองนี้ ผลจากการวิเคราะห์กรดไขมันที่ระเหยง่ายของแบคทีเรียทั้ง 30 สายพันธุ์ จะใช้เป็นส่วนหนึ่งในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อ (Indentification) ซึ่งใช้วิธีการทางด้านโมเลกุลในการทดลองต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 ผลผลิตกรดไขมันที่ระเหยง่ายของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอน

Bacterial strain	VFA Production (mM/l)*				Bacterial strain	VFA Production (mM/l)*			
	C_2	C_3	C_4	C_5		C_2	C_3	C_4	C_5
RS1	10.9	-	2.1	-	RS46	-	-	-	0.4
RS3	9.3	-	4.2	-	PG47	-	-	-	0.2
RS4	3.3	-	3.2	-	PG51	-	-	-	-
RS6	1.7	-	0.3	-	PG53	-	-	-	-
RS7	0.8	-	-	-	PG58	5.6	-	4.8	-
RS9	1.6	-	0.4	-	PG59	6.7	-	-	-
RS10	-	-	-	-	PG65	2.9	-	2	-
RS11	-	-	-	-	PG68	4.3	-	1.8	-
RS12	2.3	-	1	-	PG70	2.8	-	2.5	-
RS13	-	-	-	-	PG71	1.6	-	0.6	-
RS15	0.1	-	0.2	0.2	PG73	4.1	-	2.3	-
RS16	-	-	0.2	-	PG75	4.6	-	2.1	-
PG21	-	-	-	-	PG76	-	-	-	-
PG36	0.6	-	0.6	-	PG78	-	-	7.0	-
PG37	0.6	-	0.7	0.1	PG85	-	-	0.3	-

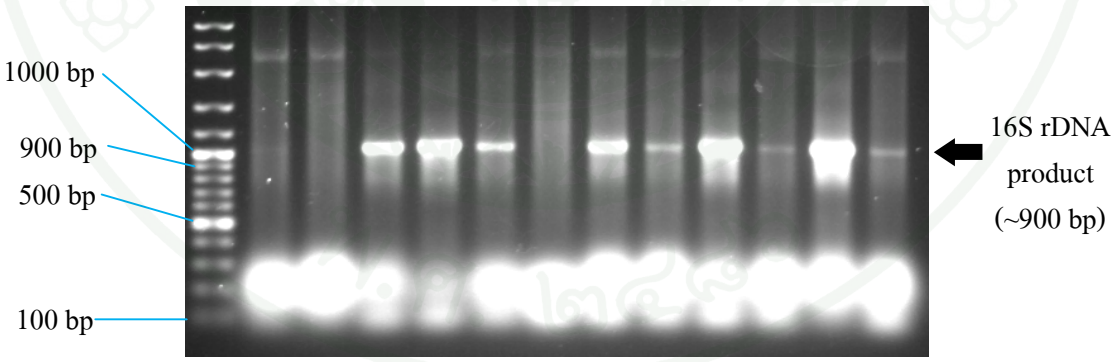
หมายเหตุ * C_2 คือ อะซิเตท, C_3 คือ โพรพิโอเนท C_4 คือ บิวทิเรท และ C_5 คือ วาเลอเรท

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก โดยใช้ความเหมือนของลำดับเบสของ 16S rDNA

จากการนำลำดับเบส 16S rDNA ที่มีความยาวประมาณ 900 เบส (ภาพที่ 9) ของแบคทีเรีย 30 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกมา ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA แบคทีเรียที่ทราบชนิดใน GenBank ด้วยวิธีการ BLAST N พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้ จำนวน 26 สายพันธุ์ มีลำดับเบสของ 16S rDNA ใกล้เคียงกับ 16S rDNA ของแบคทีเรีย 7 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 6 ได้แก่ *Butyrivibrio* sp., *Clostridium* sp., *F. succinogenes*, *Prevotella* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp. และ *Selenomonas ruminantium* เป็นแบคทีเรียที่ยังไม่ทราบชนิดอีก 4 สายพันธุ์ ซึ่งความเหมือนของ 16S rDNA ของแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิด เปรียบเทียบกับ 16S rDNA ของแบคทีเรีย 30 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกมา อยู่ในช่วง 97.30-100 เปอร์เซ็นต์

ทำการจัดกลุ่มความเหมือนของ 16S rDNA ของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่อยู่ในธนาคารยีน ด้วยการทำ Multiple-sequence alignment และสร้างแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) แบคทีเรียทั้ง 7 ชนิด สามารถจำแนกได้ดังแสดงในภาพที่ 10 ถึง ภาพที่ 16



ภาพที่ 9 การตรวจสอบหาดีเอ็นเอเป้าหมายในดีเอ็นลูกผสม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 การจำแนกความเหมือนของลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย ที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก เปรียบเทียบกับลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่อยู่ในธนาคารยีน (GenBank)

Bacterial strain	GenBank database	
	Nearest known bacteria	Identity (%)
RS10	*Butyrivibrio fibrisolvens* H10b	885/893 (99.10)
RS46	*Butyrivibrio* sp. K3	881/892 (98.77)
PG76	*Butyrivibrio fibrisolvens* WH-1	885/892 (99.22)
PG78	*Butyrivibrio fibrisolvens* WH-1	891/892 (99.89)
PG70	*Pseudobutyrivibrio ruminis* pC-XS7	883/892 (98.99)
RS15	*Clostridium bifermentans* JCM 7832	889/891 (99.78)
RS16	*Clostridium bifermentans* CM 7832	889/891 (99.78)
PG58	*Clostridium bifermentans* SH-C27	887/891 (99.55)
PG85*	*Clostridium bifermentans* JCM 7832	890/891 (99.89)
PG59	*Clostridium aminophilum* 152R-1b	884/892(97.98)
RS3*	*Fibrobacter succinogenes* R	887/890 (99.66)
RS4*	*Fibrobacter succinogenes* S85	888/890 (99.89)
PG73	*Fibrobacter succinogenes* S85	889/890 (99.89)
RS1*	*Prevotella* sp	865/889 (97.30)
RS6	*Prevotella* sp	865/889 (97.30)
RS7	*Prevotella* sp.	866/889 (97.41)
PG68	*Prevotella* sp. 326-8	881/887 (99.32)
PG21	*Streptococcus bovis* RD09	891/891 (100.00)
PG37	*Streptococcus bovis* RD09	876/891 (98.32)
PG51	*Streptococcus bovis* RD09	890/891 (99.89)
PG53	*Streptococcus bovis* RD09	888/891 (99.66)
PG65	*Streptococcus bovis* RD09	890/891 (99.89)
PG71	*Streptococcus bovis* RD09	889/891 (99.78)
PG75	*Streptococcus bovis* RD09	890/891 (99.89)
RS12*	*Staphylococcus* sp. MO28	892/894 (99.78)
RS9	*Selenomonas ruminantium* S4	887/893 (99.33)
RS11	Uncultured bacterium clone SWD34	888/891 (99.66)
PG36	Uncultured bacterium clone ALP15	886/889 (99.66)
PG47	Uncultured bacterium clone ALP15	886/889 (99.66)
RS13	Uncultured bacterium	842/900 (93.55)

หมายเหตุ * แบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวได้ดี หลังบ่มเชื้อที่ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

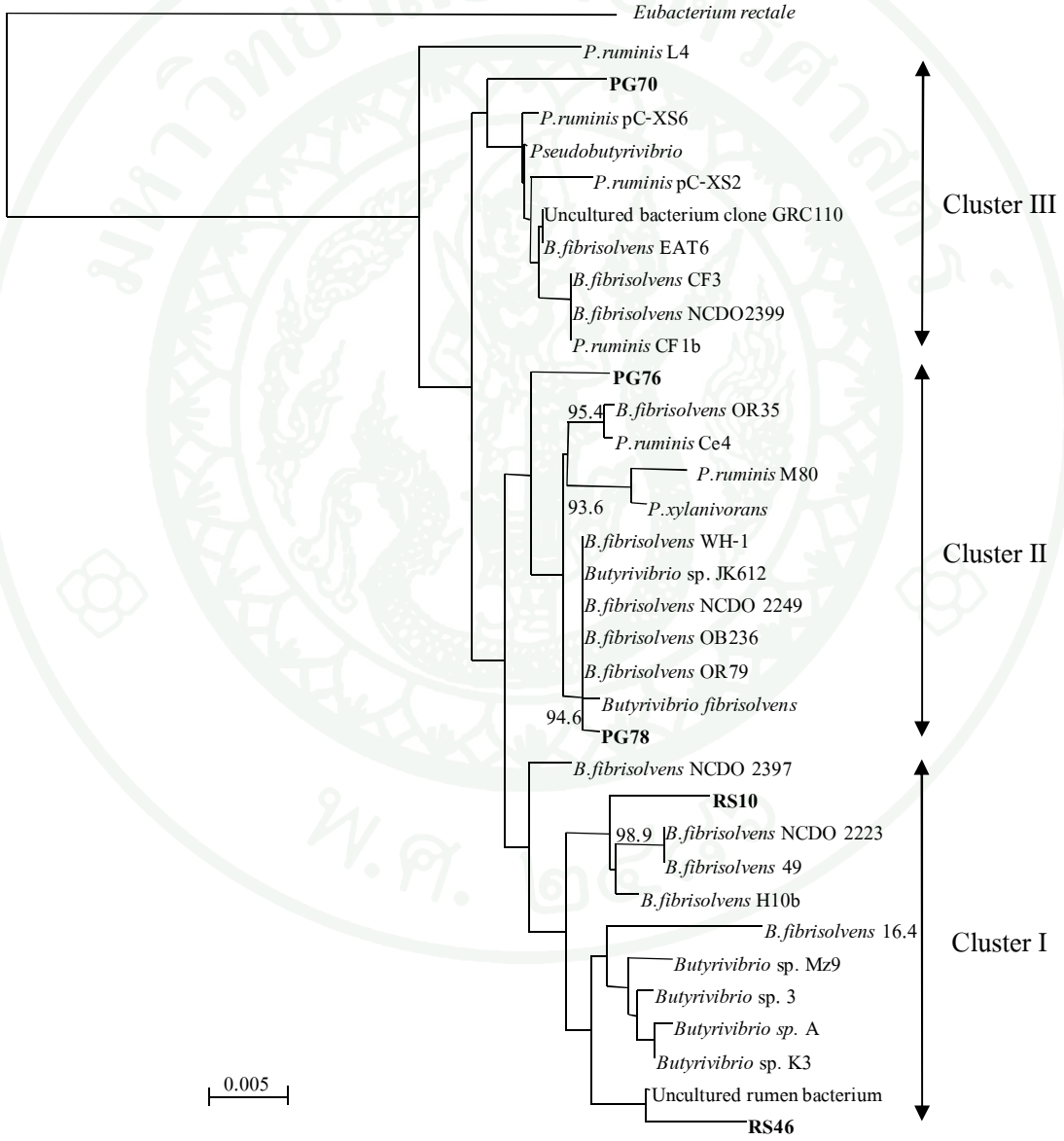
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 10 เป็นแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของ *Butyrivibrio* sp. โดยใช้ *Eubacterium rectal* เป็น out-group แสดงให้เห็นว่า *Butyrivibrio* sp สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม (Cluster I, II และ III) (สุริยะและKobayashi, 2550) ใน Cluster I ประกอบด้วย แบคทีเรียที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก สายพันธุ์ RS10 และ RS46 Cluster II ประกอบด้วย สายพันธุ์ PG76 และ PG78 และ Cluster III ประกอบด้วย สายพันธุ์ PG70 แบคทีเรียที่คัดเลือกมาทั้ง 5 สายพันธุ์ (RS10, RS46, PG70, PG76 และ PG78) เมื่อทำการย้อมติดสีแกรมพบว่าทั้งหมดติดสีแกรมลบ และมีเซลล์ลักษณะกลม เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ซึ่งไม่สามารถวัดขนาดของเซลล์ได้ โดยทั่วไป *B. fibrisolvens* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ มี flagella เซลล์มีลักษณะเป็นท่อน มีความยาวอยู่ในช่วงประมาณ 1-5 ไมโครเมตร และอาจพบเซลล์ที่มีขนาดยาวประมาณ 0.5 ไมโครเมตร (Sewell *et al.,* 1988) ซึ่งเซลล์ของแบคทีเรียที่มีลักษณะกลมบางชนิดก็อาจมีขนาดของเซลล์ประมาณ 1 ไมโครเมตร ได้เช่นกัน (Ogimoto and Imai, 1981) จึงเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียที่พบอาจมีลักษณะเซลล์เป็นท่อนสั้น (Coccoid rods) จึงทำให้มองเห็นเป็นลักษณะกลม เมื่อแบคทีเรียเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและเซลโลไบโอส พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RS10 และ PG76 วิเคราะห์ไม่พบกรดไขมันที่ระเหยง่าย แบคทีเรียสายพันธุ์ RS46 มีการผลิตวาเลอเรท แบคทีเรียสายพันธุ์ PG70 มีการผลิตอะซิเตทและบิวทิเรท และแบคทีเรียสายพันธุ์ PG78 มีการผลิตเฉพาะบิวทิเรท ถึงแม้ว่า *B. fibrisolvens* เป็นแบคทีเรียที่สำคัญในการผลิตบิวทิเรทแต่สามารถผลิตกรดชนิดอื่นๆ ได้ เช่น ฟอร์เมท อะซิเตท แลกเตท โพรพิโอเนท และซัคซิเนท (สุริยะ, 2551; Ogimoto and Imai, 1981; Suriya, 2003) ดังนั้นในการทดลองนี้ แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ไม่พบการผลิตกรดไขมันที่ระเหยง่ายอาจให้ผลผลิตชนิดอื่นที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ หรืออาจเป็นเพราะแบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถใช้ประโยชน์กลูโคสและเซลโลโอสในกระบวนการหมักได้ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตวาเลอเรทอาจเป็น *Butyrivibrio* sp. สายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตวาเลอเรทได้ แต่ยังไม่ปรากฏรายงานเกี่ยวกับความสามารถดังกล่าวของแบคทีเรียชนิดนี้ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในรายละเอียดต่อไปเพื่อสนับสนุนข้อสมมติดังกล่าว

แบคทีเรียสายพันธุ์ RS10 มีลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ความเหมือนกับ 16S rDNA ของ *B. fibrisolvens* H10b 99.10 เปอร์เซ็นต์ (885/893) สายพันธุ์ RS46 มีความเหมือนกับ *Butyrivibrio* sp. K3 98.77 เปอร์เซ็นต์ (881/892) สายพันธุ์ PG70 มีความเหมือนกับ *Pseudobutyrivibrio ruminis* pC-XS7 98.99 เปอร์เซ็นต์ (883/892) และสายพันธุ์ PG76 และ PG78 มีความเหมือนกับ *B. fibrisolvens* WH-1 99.22 เปอร์เซ็นต์ (885/892) และ 99.89 เปอร์เซ็นต์ (891/892) ตามลำดับ (ตารางที่ 6) จากแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (ภาพที่ 10) ของ *Butyrivibrio* sp. ที่สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้เป็นแบคทีเรียที่มีความน่าสนใจ มีความสามารถในการย่อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เฮมิเซลลูโลส ได้ดีและมีความสามารถในด้านอื่นอีกหลายประการ (สุริยะ, 2551; Sewell *et al.,* 1988) นอกจากนี้ใน *B. fibrisolvens* มีลักษณะพิเศษที่ได้รับสนใจมาก คือเป็นแบคทีเรียที่มีพลาสมิดอยู่ภายในเซลล์ ซึ่งในปัจจุบันได้ใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงและพัฒนายีนของ *B. fibrisolvens* ด้วยวิธีการ GMO (Cummins and Ho, 2006; Forano and Flint, 2000) ส่วน *Pseudobutyrivibrio ruminis* ก็เป็นแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย (Koike *et al.*,2003; Sundset *et al.*, 2007)



ภาพที่ 10 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *Butyrivibrio* sp. กับแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

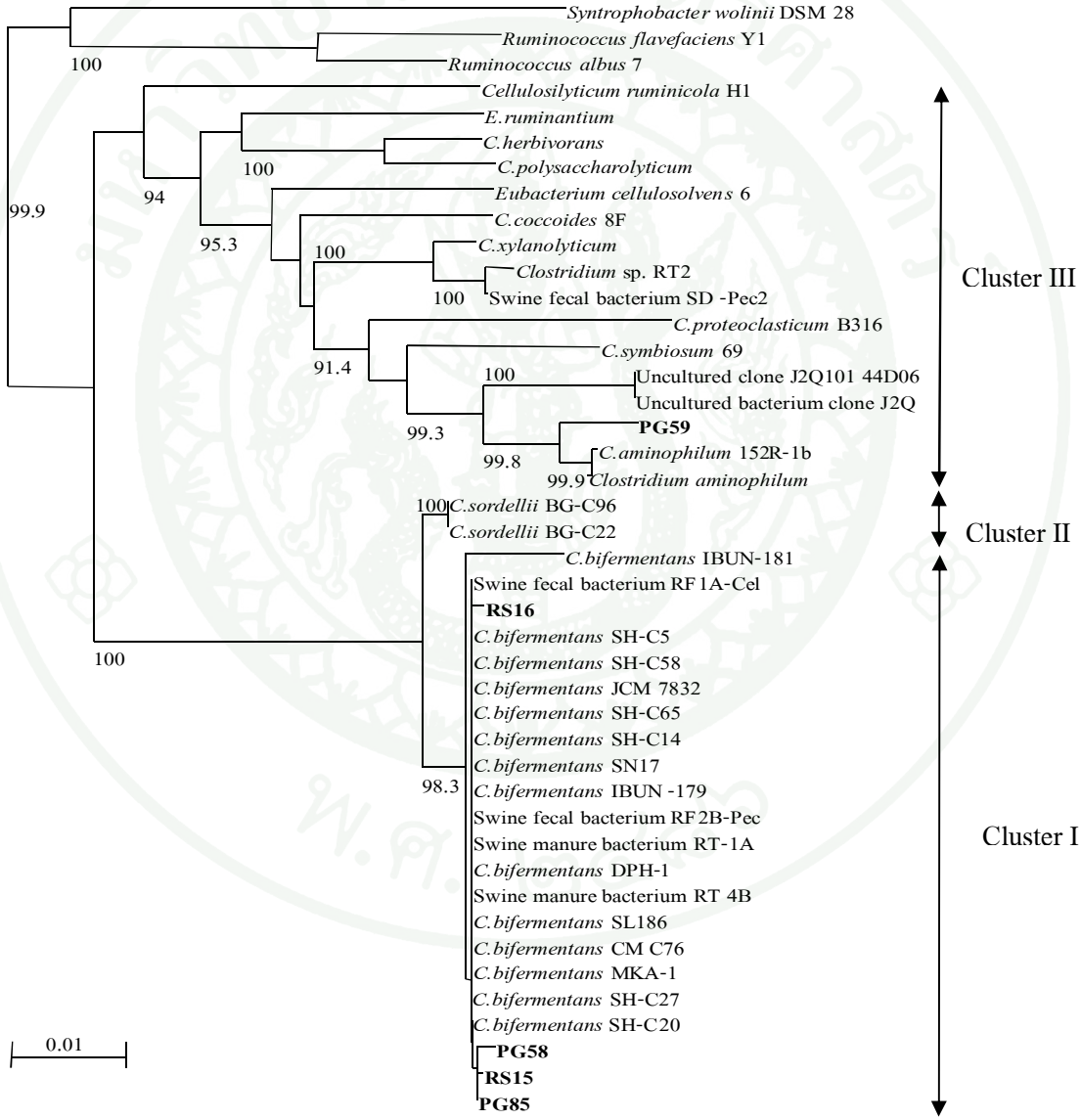
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 11 เป็นแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของ *Clostridium* spp. โดยใช้ *Syntophobacter wolinii* เป็น out-group แสดงให้เห็นว่า *Clostridium* spp.สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม (Cluster I, II และ III) (Nelson *et al.* 1998) แบคทีเรียสายพันธุ์ RS15, RS16, PG58 และ PG85 อยู่ใน Cluster I ในขณะที่ สายพันธุ์ PG59 อยู่ใน Cluster III ส่วน แบคทีเรียที่คัดเลือกมาทั้ง 5 สายพันธุ์ (RS15, RS16, PG58, PG59 และ PG85) เมื่อทำการย้อมติดสีแกรมพบว่าทั้งหมดติดสีแกรมลบ และเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบเซลล์มีลักษณะกลมแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบบางครั้งอาจพบเป็นแกรมบวก (Collins, *et al.* 1994) มีเซลล์ลักษณะเป็นท่อนยาวประมาณ 1-15 ไมโครเมตร สามารถสร้างสปอร์ได้ อย่างไรก็ตามดังที่ได้อธิบายในข้างต้นว่าแบคทีเรียที่มีลักษณะกลมบางชนิดก็อาจมีขนาดของเซลล์ประมาณ 1 ไมโครเมตร ได้เช่นกัน (Ogimoto and Imai, 1981) ดังนั้นแบคทีเรียที่พบนี้อาจมีเซลล์ที่มีลักษณะเป็นท่อนสั้น ที่มีความยาวประมาณ 1 ไมโครเมตร จึงทำให้มองเห็นเป็นลักษณะกลม *Clostridium* sp. เป็นแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใย (สุริยะ, 2551; Marichemy and Mattiasson, 2005; Monica *et al.*,2007; Sharma and Hobson, 1985) เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและเซลโลไบโอส พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RS15 มีการผลิตอะซิเตท บิวทิเรท และวาเลอเรท แบคทีเรียสายพันธุ์ PG59 มีการผลิตเฉพาะอะซิเตท สายพันธุ์ RS16 และ PG85 ผลิตเฉพาะบิวทิเรท และสายพันธุ์ PG58 ผลิตทั้งอะซิเตทและบิวทิเรท ปกติแบคทีเรียในกลุ่ม *Clostridium* sp. โดยทั่วไปให้ผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการหมัก คือ ฟอร์เมท อะซิเตท บิวทิเรท เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และแก๊สไฮโดรเจน ซึ่งมีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ (สุริยะ, 2551)

แบคทีเรียสายพันธุ์ RS15, RS16 และ PG85 มีลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ความเหมือนกับ 16S rDNA ของ *C. bifermentans* JCM7832 99.78 เปอร์เซ็นต์ (889/891), 99.78 เปอร์เซ็นต์ (889/891) และ 99.89 เปอร์เซ็นต์ (890/891) ตามลำดับ แบคทีเรียสายพันธุ์ PG58 มีความเหมือนกับ *C. bifermentans* SH-C27 99.55 เปอร์เซ็นต์ (887/891) และแบคทีเรียสายพันธุ์ PG59 มีความเหมือนกับ *C. aminophilum* 152R-1b 97.98 เปอร์เซ็นต์ (884/892) (ตารางที่ 6) จากแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (ภาพที่ 11) ของ *Clostridium* spp. ที่สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ซึ่ง *C. bifermentans* เป็นแบคทีเรียที่มีความหลากหลาย ซึ่งนอกจากในกระเพาะรูเมนแล้วยังสามารถพบได้ในสภาพแวดล้อมอื่นๆ เช่น โรงงานอุตสาหกรรมบางแห่งใช้ *C. bifermentans* บางสายพันธุ์ในการบำบัดของเสียในระบบบำบัดของเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Joe *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2003) หรือระบบระบายของเสียจากฟาร์มโคนมพบแบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กับส่วนของของแข็งประเภทเยื่อใยที่มาจากพืชอาหารสัตว์ในฟาร์ม (Sharma and Hobson, 1985) จากรายงาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของ Sundset และคณะ (2007) ที่ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของกวางป่า (Reindeer) พบว่า *C. bifermentans* บางสายพันธุ์เป็นแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใย นอกจากนี้ แบคทีเรียสายพันธุ์ PG59 ที่มีความเหมือนกับ *C. aminophilum* 152R-1b ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีลักษณะรูปไข่ สามารถย่อยเปปไทด์และกรดอะมิโน และมีผลผลิตจากการหมักเป็นอะซิเตทและบิวทิเรท แต่อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PG59 มีความสามารถในการย่อยเยื่อใยของฟางข้าวได้และมีการผลิตอะซิเตท



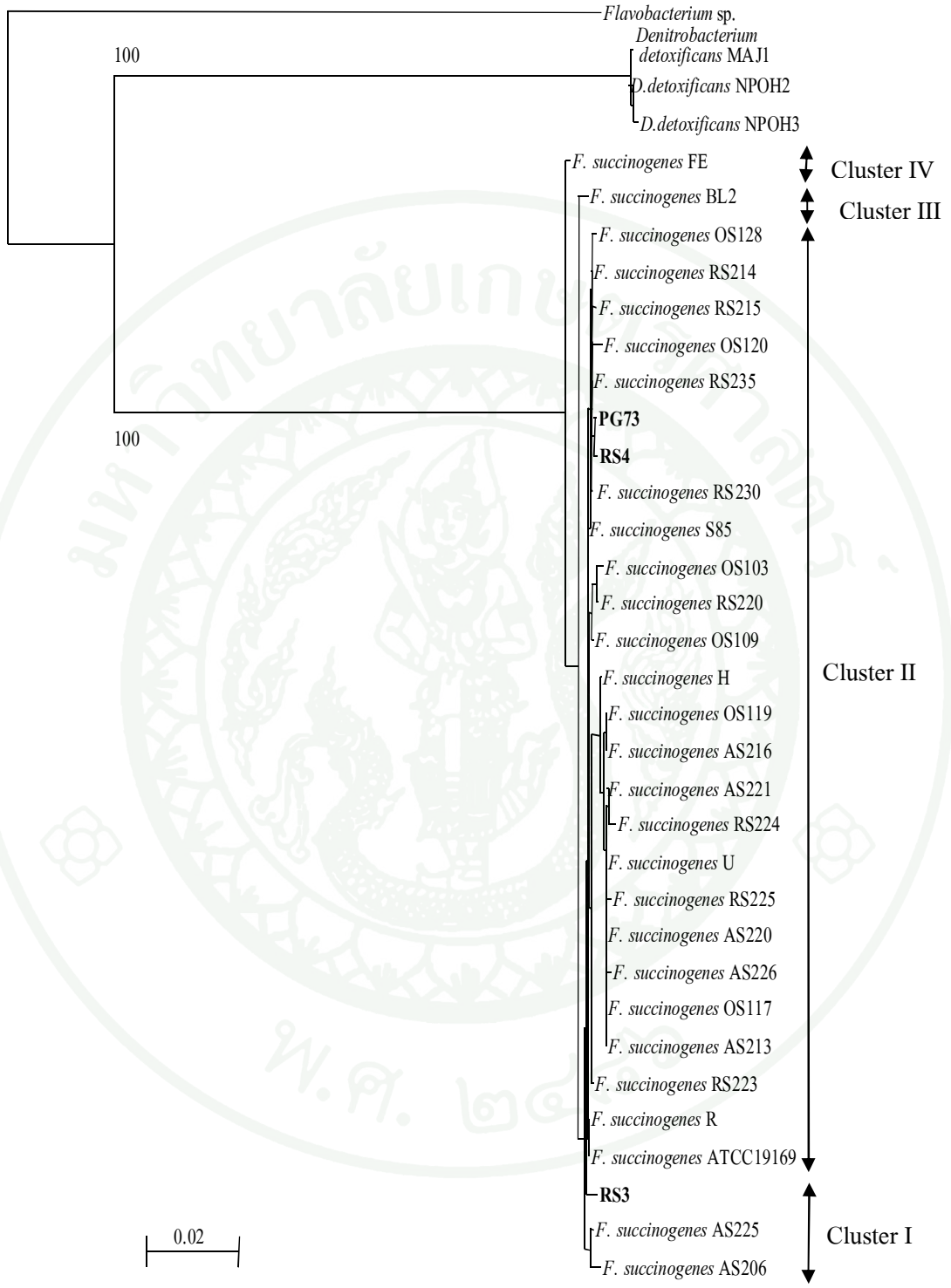
ภาพที่ 11 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *Clostridium* spp. กับแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 12 เป็นแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของ *F. succinogenes* โดยใช้ *Flavobacterium* sp. เป็น out-group แสดงให้เห็นว่า *F. succinogenes* สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม (Cluster I, II, III และ IV) (Shinkai *et al.* 2003) แบคทีเรียที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก สายพันธุ์ RS3 อยู่ใน Cluster I ส่วนอีก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ RS4 และ PG73 อยู่ใน Cluster II แบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ติดสีแกรมลบ และเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบเซลล์มีลักษณะกลม แบคทีเรียในกลุ่ม *F. succinogenes* มีลักษณะเซลล์เป็นท่อนสั้นคล้ายรูปไข่ มีความยาวประมาณ 0.3-1.5 ไมโครเมตร *F. succinogenes* เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมน ซึ่งมีความหลากหลายของสายพันธุ์ เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและเซลโลไบโอส พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มีการผลิตอะซิเตทและบิวทีเรท ปกติ *F. succinogenes* โดยทั่วไปให้ผลิตสุดท้ายที่ได้จากการหมัก คืออะซิเตทและซัคซิเนทหรือบางสายพันธุ์อาจผลิตฟอร์เมทและวาเลอเรท (สุริยะ, 2551; Ogimoto and Imai, 1981; Maillet *et al.* 2004) แต่พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกมานั้นมีการผลิตบิวทีเรท ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตบิวทิเรทได้

อย่างไรก็ตามใน ตารางที่ 6 จะเห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RS3 มีลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ความเหมือนกับ 16S rDNA ของ *F. succinogenes* R 99.66 เปอร์เซ็นต์ (887/890), แบคทีเรียสายพันธุ์ RS4 และ PG73 มีความเหมือนกับ *F. succinogenes* S85 99.89 เปอร์เซ็นต์ (888/890) และ 99.89 เปอร์เซ็นต์ (889/890) ตามลำดับ *F. succinogenes* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องและในระบบทางเดินอาหารส่วนท้าย (ลำไส้ใหญ่และไส้ติ่ง) ของสัตว์กระเพาะเดี่ยวที่กินพืชเป็นอาหารหลัก ความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนของแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความหลากหลายมาก และเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะในสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ได้รับอาหารหยาบเป็นหลัก (Brigitte *et al.,* 2001; Chen and Weimer, 2001; Kobayashi, 2006; Maillet *et al.* 2004; Montgomery *et al.*1988; Satoshi *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008; Shinkai, 2003; Weimer, 1998)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 12 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ แสดงความสัมพันธ์ของลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *F. succinogenes* กับแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

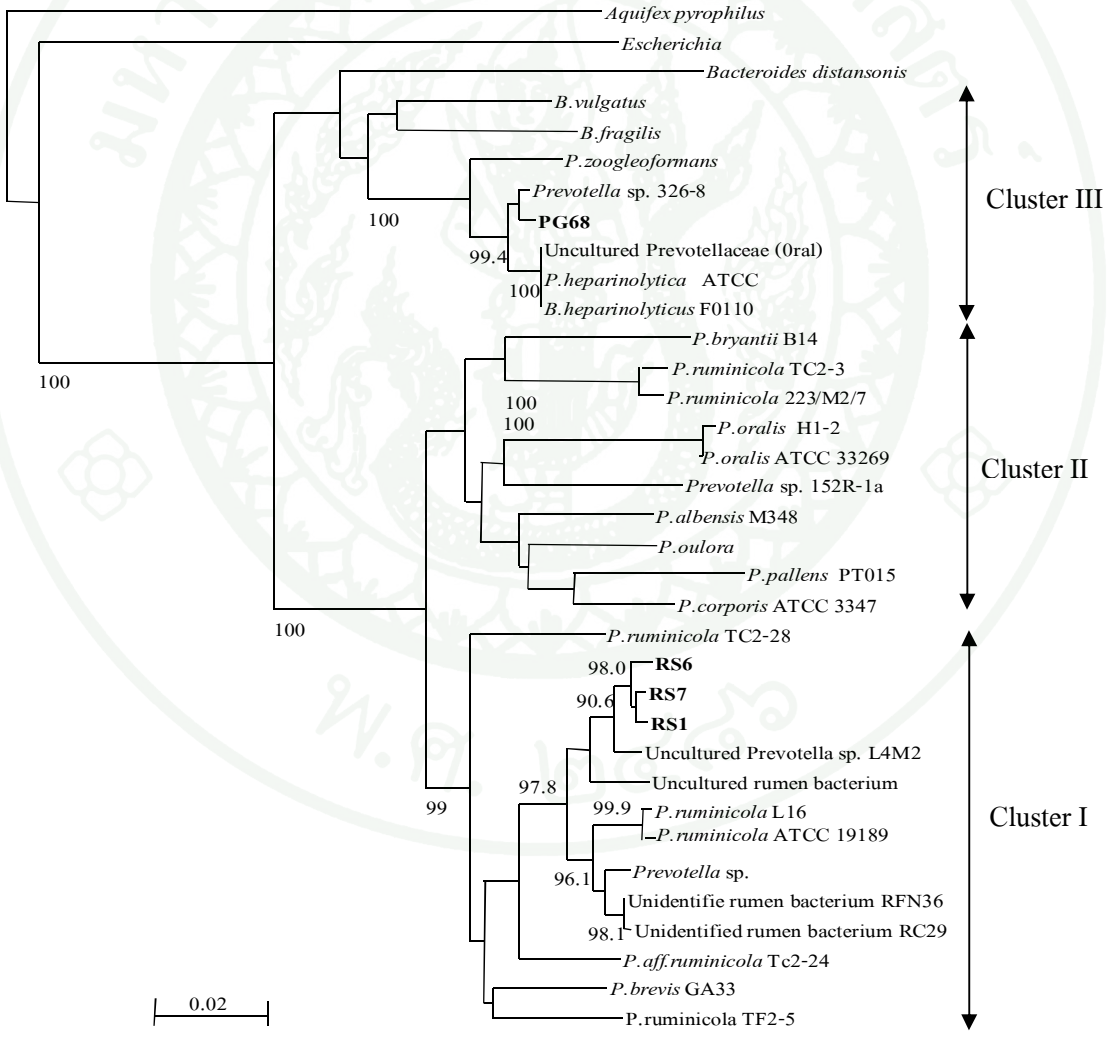
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 13 เป็นแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของ *Prevotella* spp. โดยใช้ *Aquifex pyrophilus* เป็น out-group แสดงให้เห็นว่า *Prevotella* spp.สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม (Cluster I, II และ III) (Whitford *et al.* 1998) แบคทีเรียสายพันธุ์ PG68 อยู่ใน Cluster III และใน Cluster I ประกอบด้วยแบคทีเรียที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก สายพันธุ์ RS1, RS6 และ RS7 แบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ย้อมติดสีแกรมลบ เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบเซลล์มีลักษณะกลม ลักษณะโดยทั่วไป *Prevotella* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีลักษณะเซลล์เป็นท่อน มีความยาวประมาณ 0.8-2.5 ไมโครเมตร เซลล์อาจมีลักษณะเป็นท่อนสั้น ทำให้มองเห็นเป็นลักษณะกลม เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและเซลโลไบโอส พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RS1, RS6 และ PG68 มีการผลิตอะซิเตทและบิวทิเรท ส่วนสายพันธุ์ RS7 ผลิตเฉพาะอะซิเตท อย่างไรก็ตาม *Prevotella* sp. บางสายพันธุ์ เช่น *Prevotella* subsp. *ruminicola* มีการผลิตซัคซิเนท อะซิเตท ฟอร์เมท โพรพิโอเนท บิวทิเรท ไอโซบิวทิเรท ไอโซวาเลอเรท และแลคเตทได้ (Ogimoto and Imai, 1981) จากตารางที่ 6 จะเห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RS1, RS6 และ RS7 มีลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ความเหมือนกับ 16S rDNA ของ *Prevotella* sp. 97.30 เปอร์เซ็นต์ (865/889), 97.30 เปอร์เซ็นต์ (865/889) และ 97.41 เปอร์เซ็นต์ (866/889) ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ PG68 มีความเหมือนกับ *Prevotella* sp. 326-8 99.32 เปอร์เซ็นต์ (881/887)

Prevotella spp. เป็นแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่พบมากในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง มีบทบาทสำคัญในการย่อยเฮมิเซลลูโลส เพคติน และโปรตีน และสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ซึ่งสามารถย่อยเซลลูโลสสายสั้นได้ แต่ไม่สามารถปลดปล่อยเซลลูเลสออกนอกเซลล์มาย่อยเซลลูโลสบนผนังเซลล์ของพืชได้ (สุริยะ, 2551) อย่างไรก็ตามจาก ตารางที่ 2 จะเห็นว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกมานั้นมีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวได้ แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่มีความหลากหลายมาก จากภาพที่ 13 จะเห็นว่า *P. ruminicola* สายพันธุ์ต่างๆ เช่น P. ruminicola TC2-3, P.albensis M348 และ P. ruminicola 223/M2/7 หรือ P. bryantii B14 ใน Cluster II ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกระเพาะรูเมน แต่แบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวก็สามารถพบได้ในช่องปากของมนุษย์ เช่น *P. oralis* H1-2, *P. oralis* ATCC 33269 เป็นต้น สอดคล้องกับการรายงานของ Avgustin และคณะ (2001) ซึ่งอธิบายว่าเป็นไปได้ว่าอาจพบแบคทีเรียกลุ่มที่คัดเลือกมาในช่องปากของสัตว์เคี้ยวเอื้อง และเมื่อมีการเคี้ยวเอื้องและกลืนอาหารลงไปในกระเพาะรูเมน ทำให้มีการพัฒนาของแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในกระเพาะรูเมนด้วย เช่นเดียวกันกับแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจะเห็นได้ว่าใน Cluster I แบคทีเรียสายพันธุ์ PG68 อยู่ในกลุ่มเดียวกับแบคทีเรียที่ไม่ใช่แบคทีเรียในกระเพาะรูเมน อย่างไรก็ตามใน Cluster I แบคทีเรียสายพันธุ์ RS1, RS6 และ RS7 จัดอยู่ในกลุ่ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของ *P. ruminicola* ที่อยู่ในกระเพาะรูเมน Fondevila และ Dehority (1996) รายงานว่า *P. ruminicola* สามารถช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยได้ (*R. flavefaciens* และ *F. succinogenes*) เมื่อเจริญร่วมกัน นอกจากนี้แบคทีเรียที่คัดเลือกมานั้นมีความเหมือนกับ *P. ruminicola* แต่อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวได้ (ตารางที่ 2) และนอกจากนี้ *P. ruminicola* บางสายพันธุ์มี Bacteriophages และ Plasmid อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งมีความสำคัญในการพัฒนายีนของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ดังนั้นแบคที่เรียที่คัดเลือกได้อาจเป็น *P. ruminicola* สายพันธุ์ใหม่ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก



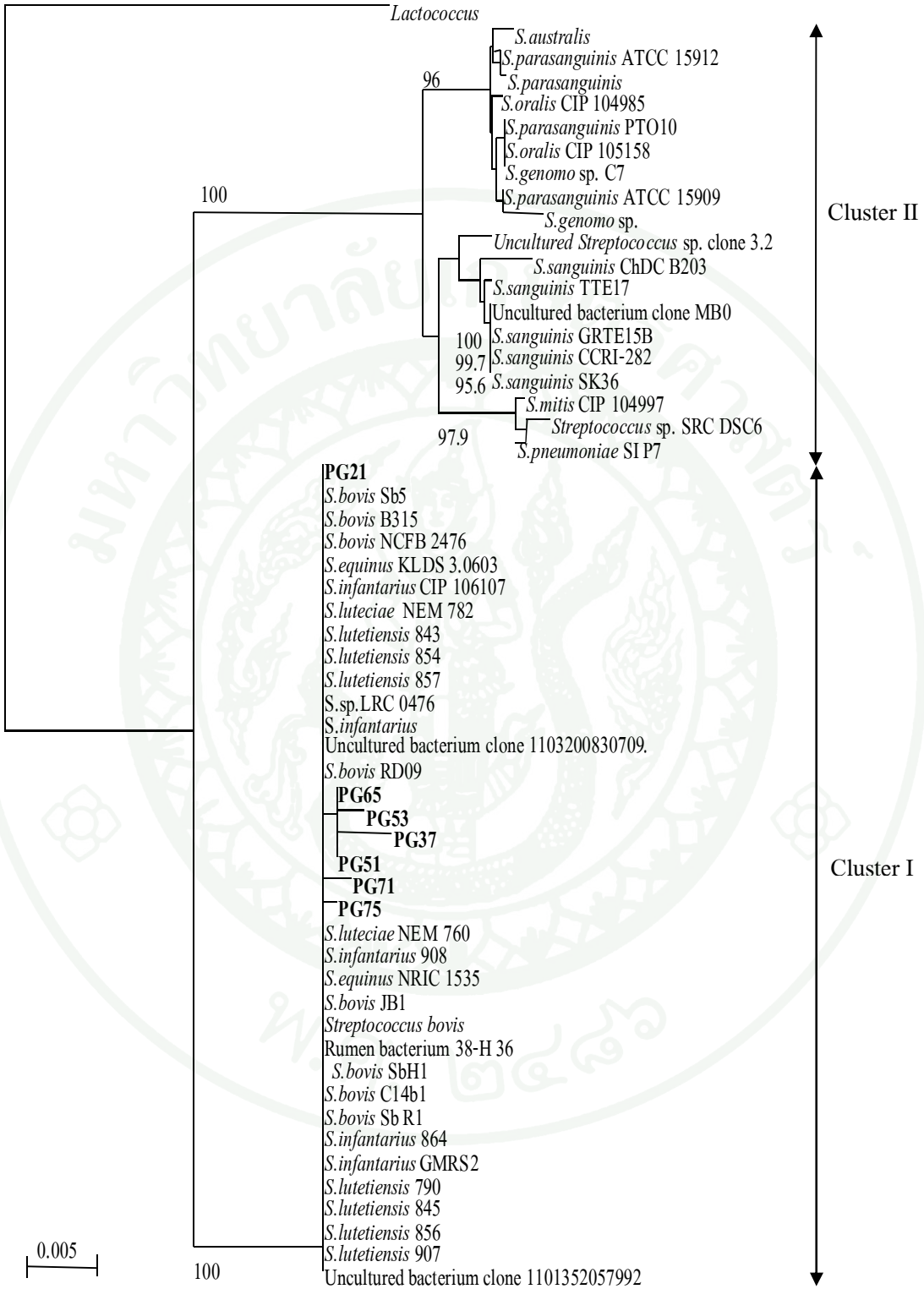
ภาพที่ 13 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ แสดงความสัมพันธ์ของลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *Prevotella* spp. กับแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 14 เป็นแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของ *Streptococcus* spp. โดยใช้ *Lactococcus* เป็น out-group แสดงให้เห็นว่า *Streptococcus* spp.สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม (Cluster I และ II) (Nelson *et al.* 1998) ใน Cluster I เป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช่แบคทีเรียในกระเพาะรูเมน และ Cluster II เป็นแบคทีเรียที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลักสายพันธุ์ PG21, PG37, PG51, PG53, PG65, PG71 และ PG75 อยู่ใน Cluster I แบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ย้อมติดสีแกรมลบ เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบเซลล์มีลักษณะกลม โดยทั่วไป *Streptococcus* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะเซลล์กลม แต่บางครั้งอาจพบเป็นแกรมลบ (สุริยะ, 2551) เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและเซลโลไบโอส พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PG21, PG51 และ PG53 ไม่การผลิตกรดไขมันที่ระเหยง่าย สายพันธุ์ PG37, PG65, PG71 และ PG75 มีการผลิตอะซิเตทและบิวทิเรท นอกจากนี้ในสายพันธุ์ PG37 ยังมีการผลิตวาเลอเรทด้วย *Streptococcus* sp. บางสายพันธุ์ เช่น *S. bovis* มีการผลิตฟอร์เมท อะซิเตท เอทานอล และแลคเตท (สุริยะ, 2551) แต่ไม่พบรายงานเกี่ยวกับการผลิตวาเลอเรทของแบคทีเรียชนิดนี้ ส่วนแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่ไม่พบการผลิตกรดไขมันที่ระเหยง่าย ในการทดลองนี้ แบคทีเรียบางสายพันธุ์ดังกล่าวอาจให้ผลผลิตชนิดอื่นที่ไม่ได้ทำการวิเคราะห์ จากตารางที่ 6 จะเห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PG21, PG37, PG51, PG53, PG65, PG71 และ PG75 มีลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ความเหมือนกับ 16S rDNA ของ *S. bovis* RD09 100 เปอร์เซ็นต์ (891/891), 98.32 เปอร์เซ็นต์ (876/891), 99.89 เปอร์เซ็นต์ (890/891), 99.66 เปอร์เซ็นต์ (888/891), 99.89 เปอร์เซ็นต์ (890/891), 99.78 เปอร์เซ็นต์ (889/891) และ 99.89 เปอร์เซ็นต์ (890/891) ตามลำดับ แบคทีเรียที่คัดเลือกมา

S. bovis เป็นแบคทีเรียที่พบมากในกระเพาะรูเมนของสัตว์ที่ได้รับอาหารข้นปริมาณสูงๆ และสามารถเจริญได้ดีในสภาวะความเป็นกรดสูง มีบทบาทสำคัญในการย่อยแป้งและน้ำตาล และ *S. bovis* บางสายพันธุ์สามารถย่อยเพคตินได้ (สุริยะ, 2551; Russel *et al.* 1981) แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกมานั้นมีบางสายพันธุ์ (PG75) ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวได้ดี ซึ่งไม่พบว่าเคยมีรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของ *S. bovis* ดังนั้นแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เหล่านี้จึงอาจเป็น *S. bovis* สายพันธุ์ใหม่ที่มีบทบาทในการย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



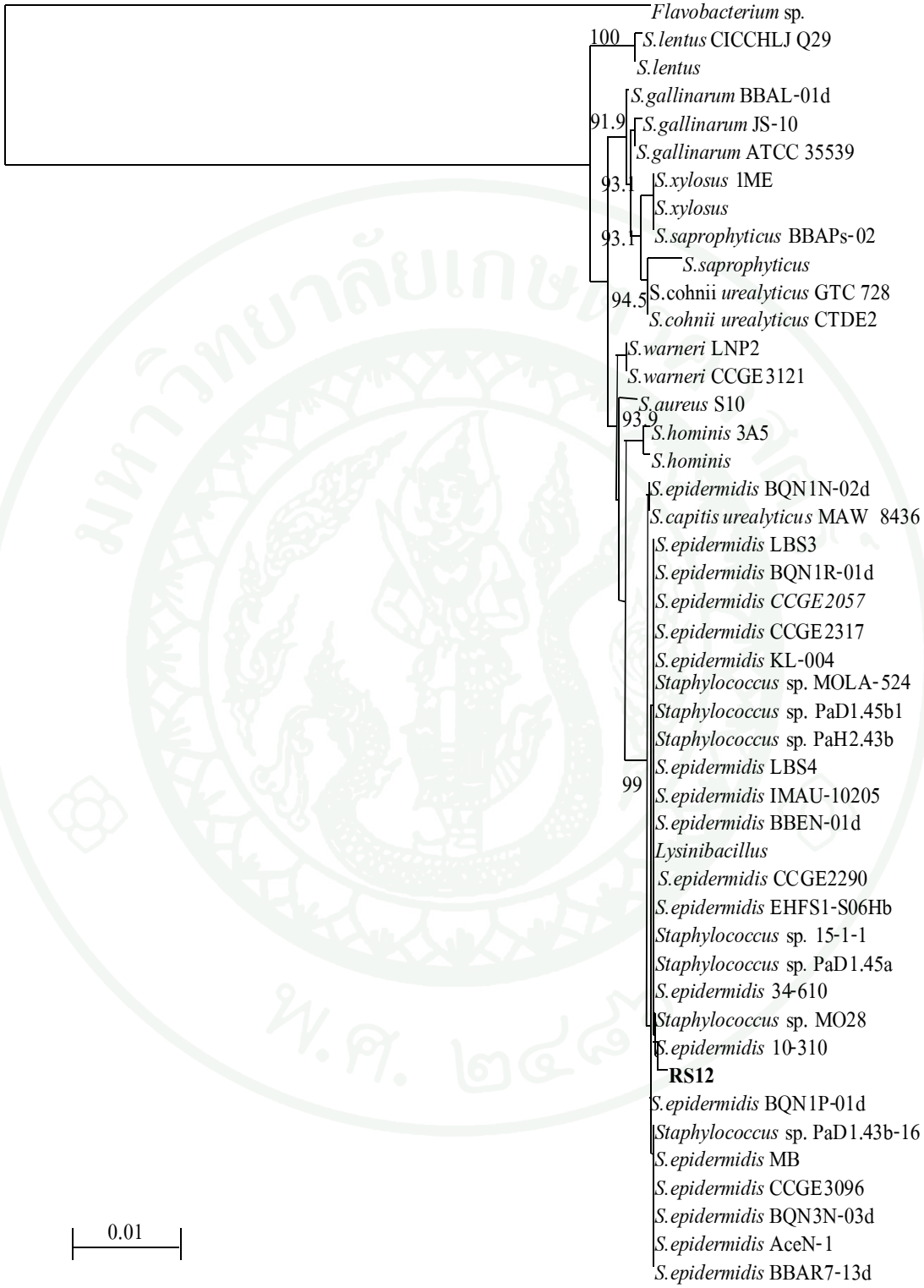
ภาพที่ 14 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ แสดงความสัมพันธ์ของลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *Streptococcus* spp. กับแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 15 เป็นแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของ *Staphylococcus* spp. โดยใช้ *Flavobacterium* sp. เป็น out-group จะเห็นว่ามีแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลักเพียง 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ RS12 เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบเซลล์มีลักษณะเซลล์กลม ย้อมติดสีแกรมลบ เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและเซลโลไบโอส พบว่ามีการผลิตอะซิเตทและบิวทิเรท สายพันธุ์ RS12 เป็นสายพันธุ์ที่มีความเหมือนกับ *Staphylococcus* spp. จากภาพแผนภูมิต้นไม้ จะเห็นว่า *Staphylococcus* spp. สายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกระเพาะรูเมนและไม่ใช่แบคทีเรียที่อยู่ในกระเพาะรูเมน มีความสัมพันธ์ของ
16S rDNA ที่ใกล้เคียงกันมาก

Staphylococcus spp. เป็นแบคทีเรียที่มีความหลากหลาย อาจพบได้ทั้งแกรมลบหรือแกรมบวก (Kodjikian *et al.*, 2003; Laukova, 1994; McLean, 1985; Otto, 2009; Sundset *et al.*, 2007) ซึ่งสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อม ในผลิตภัณฑ์อาหาร หรือในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น *S. epidermidis* บางสายพันธุ์ ที่พบว่าเป็นเชื้อโรคในระบบการมองเห็น (Kodjikian *et al.*, 2003) หรือ *S. xylosus* ที่พบในนมโคหรือนมแกะ (Simonova *et al.*, 2006) แต่สามารถพบได้ในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทหลักในการย่อยสลายยูเรียอีกด้วย ให้ผลผลิตจากการหมักเป็นแอมโมเนียและแลคเตท (Laukova, 1994; McLean, 1985; Van Wyk, 1975; Sundset *et al.*, 2007) ตารางที่ 6 จะเห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RS12 มีลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ความเหมือนกับ 16S rDNA ของ *Staphylococcus* sp. MO28 99.78 เปอร์เซ็นต์ (892/894) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียสายพันธุ์ RS12 มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวได้ดี (ตารางที่ 2) และให้ผลผลิตจากการหมักเป็นอะซิเตทและบิวทิเรท ซึ่งไม่พบการรายงานเกี่ยวกับคุณสมบัติดังกล่าวของ *Staphylococcus* spp. ดังนั้นแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เหล่านี้จึงอาจเป็น *Staphylococcus* spp. สายพันธุ์ใหม่ที่มีบทบาทในการย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



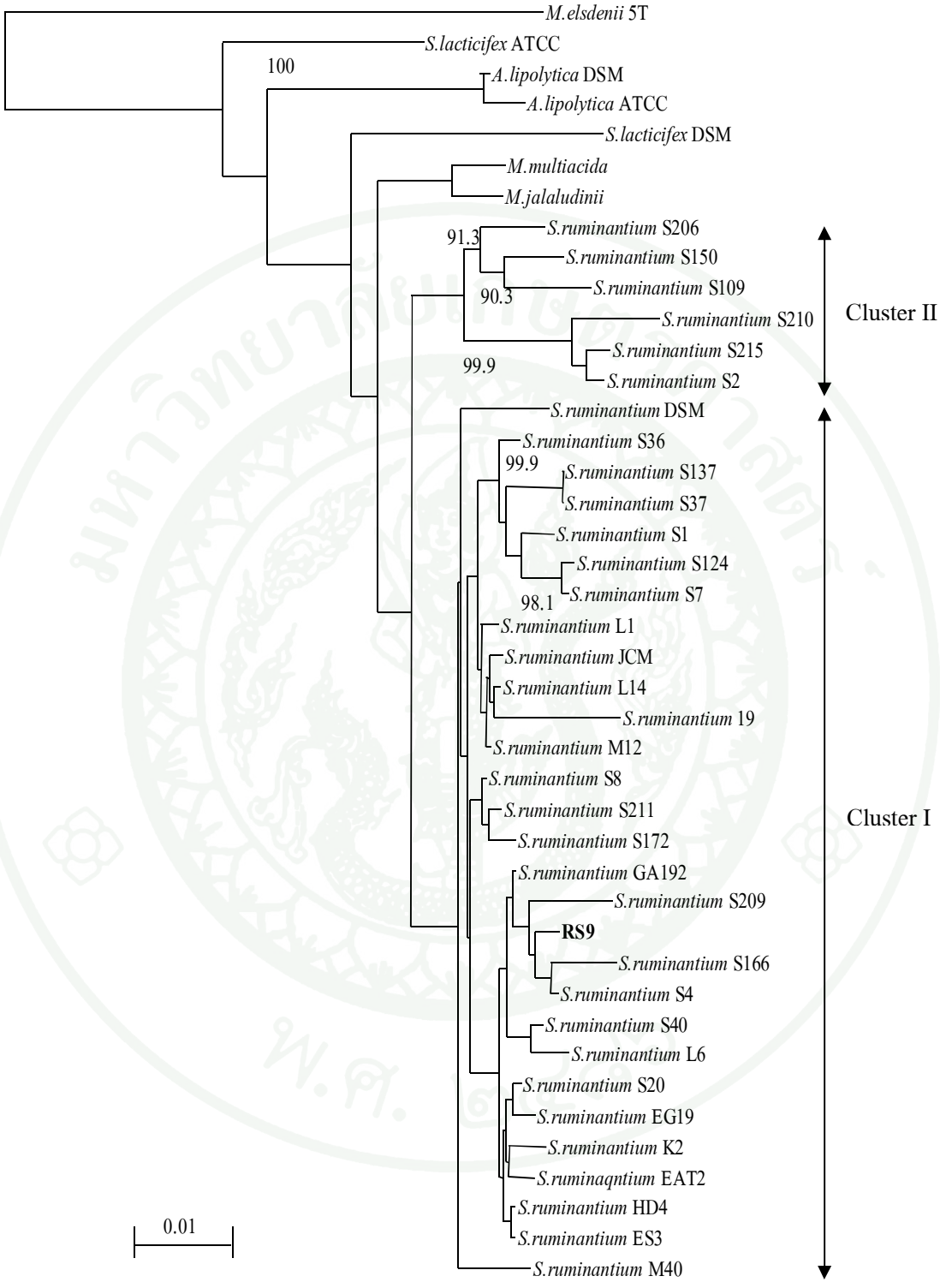
ภาพที่ 15 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ แสดงความสัมพันธ์ของลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *Staphylococcus* spp. กับแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 16 เป็นแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของ *S. ruminatium* โดยใช้ *Megasphaera elsdenii* เป็น out-group แสดงให้เห็นว่า *S. ruminantium* สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม (Cluster I และ II) (Sawanon, 2003) จะเห็นว่ามีแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลักเพียง 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ RS9 ที่มีความเหมือนกับ *S. ruminantium* ซึ่งอยู่ใน Cluster I เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า พบเซลล์มีลักษณะเซลล์กลมรูปไข่ต่อกันเป็นสายสั้นๆ ย้อมติดสีแกรมลบ เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสและเซลโลไบโอส มีการผลิต อะซิเตท และบิวทิเรท ลักษณะโดยทั่วไปของ *S. ruminantium* มีลักษณะเซลล์เป็นท่อนคล้าย เสี้ยวพระจันทร์ ย้อมติดสีแกรมลบ มี Flagella เซลล์มีความยาวประมาณ 2-10 ไมโครเมตร สามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลายชนิด แต่ไม่สามารถย่อยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส หรือเพคตินบนผนังเซลล์พืชได้ มีผลผลิตจากการหมักเป็น แลคเตท โพรพิโอเนท อะซิเตท และซัคซิเนท และเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตโพรพิเนท คือสามารถเปลี่ยนซัคซิเนทหรือแลคเตทไปเป็นโพรพิโอเนทได้ และสามารถย่อยเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลสสายสั้นได้ นอกจากนี้ *S. ruminantium* บางสายพันธุ์ยังสามารถผลิตวิตามินบี 12 และสามารถย่อยโปรตีนและยูเรียได้อีกด้วย (สุริยะ, 2551; Ogimoto and Imai, 1981)

ตารางที่ 6 จะเห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ RS9 มีลำดับเบสของ 16S rDNA ที่มีความเหมือนกับ 16S rDNA ของ *S. ruminantium* S4 99.33% (887/893) แบคทีเรียสายพันธุ์ RS9 มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวได้ดี (ตารางที่ 2) Sawanon (2003) รายงานว่า *S. ruminantium* มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของถั่วอัลฟาฟ่าได้เล็กน้อย อย่างไรก็ตาม *S. ruminantium* สามารถช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยได้(*R. flavefaciens* และ *R. albus*) เมื่อเจริญร่วมกัน (Chen and Weimer, 2001; Sawanon and Kobayashi, 2006) นอกจากนี้ *S. ruminantium* ยังมีลักษณะพิเศษที่ได้รับความสนใจศึกษาเป็นอย่างมากในปัจจุบัน คือ พลาสมิดที่อยู่ภายในเซลล์ซึ่งมีเป็นจำนวนมาก (สุริยะ, 2551) มีประโยชน์ในการพัฒนาและปรับปรุงยีนของแบคทีเรีย ดังนั้นแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เหล่านี้อาจเป็น *S. ruminantium* สายพันธุ์ใหม่ที่มีบทบาทในการย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 16 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ แสดงความสัมพันธ์ของลำดับเบสของ 16S rDNA ของ *S. ruminatium* กับแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนนของกระบือปลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียอีก 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ RS11, RS13, PG36 และ PG47 (ตารางที่ 6) มีลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ความเหมือนกับ 16S rDNA ของ Uncultured bacterium clone SWD34 99.66% (888/891), Unculture bacterium 93.55% (842/900), Uncultured bacterium clone ALP15 99.66% (886/889) และ Uncultured bacterium clone ALP15 99.66% (886/889) ตามลำดับ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ยังไม่ได้รับการจำแนกชนิด (สุริยะ, 2551; Kobayashi, 2006; Sun *et al.*, 2008; Sundset *et al.*, 2007) ดังนั้นแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ นี้อาจเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

การทดลองที่ 2 การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกมาได้ในหลอดทดลอง (*In vitro* study)

ความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใย

จากการนำแบคทีเรียบริสุทธิ์มาทำการวัดความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของ ฟางข้าว หญ้าขน และเซลลูโลสบริสุทธิ์ (ตารางที่ 7) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 30 สายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยค่อนข้างหลากหลาย โดยจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียที่อยู่ในกระเพาะรูเมนของกระบือแม้จะมีลักษณะของเซลล์ที่คล้ายกันและย้อมติดสีแกรมได้เหมือนกัน แต่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยได้แตกต่างกันมาก นั่นแสดงให้เห็นในเบื้องต้นว่า แม้จะเป็นแบคทีเรียกลุ่มเดียวกัน แต่ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยก็อาจมีความแตกต่างกัน โดยพบแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายเยื่อใยทั้งสามชนิด (RS, PG, CP) ได้ดี จำนวน 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 4) คือ *Prevotella* sp. RS1 (26.04, 26.16 และ 35.81 %DM ตามลำดับ), *F. succinogenes* RS3 (27.32, 33.63 และ 24.39 %DM ตามลำดับ), *F. succinogenes* RS4 (33.90, 31.69 และ 24.96 %DM ตามลำดับ), *Staphylococcus* sp. RS12 (23.14, 23.28 และ 28.98 %DM ตามลำดับ) และ *Clostridium* sp. PG85 (23.99, 25.56 และ 25.82 %DM ตามลำดับ)

แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวสูง ได้แก่ สายพันธุ์ *Prevotella* sp. RS6, *Prevotella* sp. RS7, *Selenomonas ruminantium* RS9, *Streptococcus* sp. RS13, *Clostridium* sp. RS16, *F. succinogenes* PG73 และ *Streptococcus* sp. PG75 แต่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยจากหญ้าขนและเซลลูโลสบริสุทธิ์ได้ต่ำ อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้ประโยชน์จากเยื่อใยของฟางข้าว ซึ่งองค์ประกอบของผนัง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เซลล์มีซิลิกาและลิกนินสูง (Doyle *et al.*, 1986; Jung *et al.*, 1993; Van Soest and Jone, 1968; Balasta *et al.* 1987; Van Soest, 2006; Lam *et al.,* 2005) เช่นเดียวกับสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวและหญ้าขนได้ดี ได้แก่ *Butyrivibrio* sp. RS10, Uniedentified bacterium RS11 และ *Clostridium* sp. RS15 แต่แบคทีเรียสายพันธุ์เหล่านี้มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของเซลลูโลสบริสุทธิ์ได้ต่ำ อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้ประโยชน์จากเซลลูโลสบริสุทธิ์ได้ต่ำ จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความหลากหลายในการใช้ประโยชน์จากเยื่อใย ซึ่งบางสายพันธุ์สามารถใช้ประโยชน์เยื่อใยชนิดใดชนิดหนึ่งได้อย่างจำเพาะ หรือบางสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้ประโยชน์จากเยื่อใยได้หลากหลาย (Kobayashi, 2006; Sawanon, 2003)

สุริยะ และ Kobayashi (2550) ศึกษาแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย *B. fibrisolvens* ที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของแกะ คือ *B. fibrisolvens* S-28 และจากกระเพาะรูเมนของกวางป่า *B. fibrisolvens* OB156 โดยใช้เยื่อใยของกระดาษกรอง ถั่วอัลฟาฟ่า หญ้าออร์ชาร์ด และฟางข้าว พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. fibrisolvens* S-28 มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยจากธรรมชาติได้ดี แต่ไม่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสบริสุทธิ์จากกระดาษกรองได้ ส่วนสายพันธุ์ *B. fibrisolvens* OB156 ไม่สามารถย่อยสลายเยื่อใยทุกชนิด สอดคล้องกับ Shinkai (2003) ที่ทำการศึกษาในแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย *F. succinogenes* พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยที่หลากหลายเช่นกัน แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของการใช้ประโยชน์ได้ของเยื่อใยของแบคทีเรียแต่ละชนิด จากที่กล่าวมาข้างต้น เยื่อใยต่างชนิดกันอาจมีองค์ประกอบหรือโครงสร้างที่แตกต่างกันด้วย อาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่มีผลต่อความสามารถในการย่อยได้ของเยื่อใย เพราะแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยองค์ประกอบเหล่านั้นแตกต่างกัน ซึ่งองค์ประกอบของเยื่อใยของลำต้นพืชแต่ละส่วนมีความแตกต่างกัน หรือสารประกอบบางอย่างในเยื่อใยเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการย่อยได้ของแบคทีเรีย (Jin and Chen, 2006; Van Soest, 2006)

อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 5 สายพันธุ์ ที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายเยื่อใยของทั้งฟางข้าว หญ้าขนสด และผงเซลลูโลสบริสุทธิ์ ได้แก่ คือ *Prevotella* sp. RS1, *F. succinogenes* RS3, *F. succinogenes* RS4, *Staphylococcus* sp. RS12 และ *Clostridium* sp. PG85

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าว หญ้าขนสด และผงเซลลูโลส ในหลอดทดลองของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก หลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Bacterial strain	Digestibility (%DM)		
	Rice straw	Paragrass	Cellulose powder
Butyrivibrio sp. RS10	27.77	22.31	6.84
Butyrivibrio sp. RS46	4.06	4.68	0.54
Butyrivibrio sp.PG76	8.22	7.53	1.60
Butyrivibrio sp. PG78	3.51	4.23	2.44
Pseudobutyrivibrio sp. PG70	4.44	13.12	1.54
Clostridium sp. RS15	21.08	24.35	4.48
Clostridium sp. RS16	16.75	5.17	1.55
Clostridium sp. PG58	10.32	4.37	1.88
Clostridium sp. PG59	4.41	6.14	22.52
Clostridium sp. PG85*	23.99	25.56	25.82
F. succinogenes RS3*	27.32	33.63	24.39
F. succinogenes RS4*	33.90	31.69	24.96
F. succinogenes PG73	41.06	4.85	2.36
Prevotella sp. RS1*	26.04	26.16	35.81
Prevotella sp. RS6	16.97	2.46	1.75
Prevotella sp. RS7	17.77	3.95	1.38
Prevotella sp. PG68	3.22	9.14	1.71
Streptococcus sp. PG21	7.65	5.23	4.06
Streptococcus sp. PG37	3.25	13.84	2.48
Streptococcus sp. PG51	3.32	9.11	3.59
Streptococcus sp. PG53	4.97	14.38	4.06
Streptococcus sp. PG65	3.43	13.48	2.20
Streptococcus sp. PG71	4.26	5.90	1.41
Streptococcus sp. PG75	35.14	5.66	0.55
Staphylococcus sp. RS12*	23.14	23.28	28.98
Selenomonas ruminantium RS9	17.90	2.26	2.38
Unidentified bacterium RS11	38.50	28.02	3.84
Unidentified bacterium RS13	24.87	9.19	0.94
Unidentified bacterium PG36	3.22	11.19	2.06
Unidentified bacterium PG47	3.11	10.53	2.23

หมายเหตุ * แบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่มีศักภาพสูงในการย่อยสลายเยื่อใยทั้งสามชนิด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์ที่เกี่ยวกับการย่อยสลายเยื่อใย

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์หลักที่ใช้ในการย่อยสลายเยื่อใย คือ เซลลูเลสและไซลาเนส ซึ่งเป็นการศึกษาถึงกิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์ของแบคทีเรียจำนวน 30 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกมา พบว่ามีแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ ที่กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยสูง แสดงในตารางที่ 8 ได้แก่ *Prevotella* sp. RS1, *F. succinogenes* RS3, *F. succinogenes* RS4, *Staphylococcus* sp. RS12, *Clostridium* sp. PG59 และ *Clostridium* sp. PG85 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส เท่ากับ 16.25, 2.14, 1.41, 7.68, 8.83 และ 7.28 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตรของเชื้อ ตามลำดับ มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส เท่ากับ 27.71, 2.92, 3.41, 6.67, 9.07 และ 9.75 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตรของเชื้อ ตามลำดับ และมีโปรตีนรวม เท่ากับ 0.693, 0.014, 0.035, 0.022, 0.155และ 0.070 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของเชื้อ โดยเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของเอนไซม์ย่อยเยื่อภายในเซลล์กับปริมาณโปรตีนรวม พบว่าแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (Specific cellulase activity) เท่ากับ 23.461, 153.58, 52.14, 345.05, 56.938 และ 103.508 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ตามลำดับ และมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (Specific xylanase activity) เท่ากับ 40.005, 210.216, 97.128, 299.580, 58.485 และ 138.628 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส ภายในเซลล์ของแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ ค่อนข้างสูง โดย *Staphylococcus* sp. RS12 มีกิจกรรมของเอนไซม์สภายในเซลล์ดีที่สุด อย่างไรก็ตามแบคทีเรียสายพันธ์ *Prevotella* sp. RS6 และ *Prevotella* sp. RS7 ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสค่อนข้างต่ำ (6.92 และ 13.93 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมของโปรตีน) แต่จะเห็นได้ว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ค่อนข้างสูงคือ 254.76 และ 96.630 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมของโปรตีน ตามลำดับ

แบคทีเรียสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยสูงทั้ง 6 สายพันธุ์ มีความสอดคล้องกับความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยที่สูงด้วย ยกเว้น *Clostridium* sp. PG59 ซึ่งมีความสามารถในการย่อยเฉพาะเซลลูโลสบริสุทธิ์สูง (22 %DM) อาจเป็นเพราะแบคทีเรียชนิดนี้ผลิตได้เฉพาะเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสเท่านั้น ในขณะที่การย่อยสลายเยื่อใยที่เป็นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดทำงานร่วมกัน เช่น Cellobiase, Cellobiosidase, Cellodextrinase และ Glucanase เป็นต้น ในทางตรงกันข้ามแบคทีเรีย Unidentified bacterium RS11, Unidentified bacterium RS13, *Streptococcus* sp. PG21 และ *Streptococcus* sp. PG51 ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์ หรือสายพันธุ์ *Clostridium* sp. RS15, Uniedentified bacterium PG36, *Streptococcus* sp. PG37, *Butyrivibrio* sp. RS46, Uniedentified bacterium PG47,

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Streptococcus sp. PG53, *Clostridium* sp.PG58, *Streptococcus* sp. PG65, *Prevotella* sp. PG68, *Streptococcus* sp. PG71 และ *Streptococcus* sp. PG75 ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เพียงชนิดเดียวหรือมีน้อยมาก อาจเป็นเพราะแบคทีเรียเหล่านี้ผลิตเอนไซม์ออกมาน้อยมากและเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์จนหมดหรือเหลือเพียงเล็กน้อย โดยไม่มีการเก็บสะสมเอนไซม์ไว้ภายในเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับหลายๆ งานวิจัยที่กล่าวถึงแบคทีเรียหลายชนิดที่มีความสามารถปลดปล่อยเอนไซม์ย่อยเยื่อใยออกมานอกเซลล์สูงมาก (สุริยะ และ Kobayashi, 2550; Maillet *et al.,* 2004; Forsberg, 1981) เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายเยื่อใยของแบคทีเรียจะเกิดขึ้นที่นอกเซลล์ ดังนั้นการย่อยสลายเยื่อใยจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อแบคทีเรียสามารถผลิตและปลดปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ได้เท่านั้น นอกจากนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอส ซึ่งอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยภายในเซลล์ของแบคทีเรีย (สุริยะ และ Kobayashi ,2550 ; สุริยะ, 2551; Wood *et al.,* 1982)

จากการทดลองนี้พบว่ามีแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูง จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *Prevotella* sp. RS1, *F. succinogenes* RS3, *F. succinogenes* RS4, *Staphylococcus* sp. RS12 และ *Clostridium* sp. PG85 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยสูง และมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของ ฟางข้าว หญ้าขน และเซลลูโลสบริสุทธิ์ที่สูงด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสภายในเซลล์ของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอสเป็นแหล่งคาร์บอน

Bacterial strain	Enzyme activity (nMol/min/ml culture)		Total Protein (intracellular) (mg/ml culture)	Specific activity (nMol/min/mg protein)	
	Cellulase	Xylanase		Cellulase	Xylanase
Butyrivibrio sp. RS10	0.204	1.469	0.027	7.547	54.260
Butyrivibrio sp. RS46	1.453	0.000	0.091	15.885	0.000
Butyrivibrio sp.PG76	1.353	0.413	0.117	11.524	3.521
Butyrivibrio sp. PG78	0.204	0.444	0.019	10.623	23.101
Pseudobutyrivibrio sp. PG70	0.200	0.000	0.026	7.831	0.000
Clostridium sp. RS15	0.000	3.227	0.055	0.000	58.982
Clostridium sp. RS16	0.610	0.114	0.125	4.897	0.918
Clostridium sp. PG58	0.000	0.651	0.046	0.000	14.277
Clostridium sp. PG59	8.828	9.068	0.155	56.938	58.485
Clostridium sp. PG85*	7.283	9.754	0.070	103.508	138.628
F. succinogenes RS3*	2.136	2.924	0.014	153.582	210.216
F. succinogenes RS4*	1.830	3.409	0.035	52.145	97.128
F. succinogenes PG73	0.033	0.677	0.056	0.601	12.186
Prevotella sp. RS1*	16.248	27.706	0.693	23.461	40.005
Prevotella sp. RS6	0.068	2.439	0.010	6.920	247.835
Prevotella sp. RS7	0.175	1.215	0.013	13.928	96.630
Prevotella sp. PG68	0.737	0.000	0.044	16.581	0.000
Streptococcus sp. PG21	0.000	0.000	0.015	0.000	0.000
Streptococcus sp. PG37	0.000	0.103	0.041	0.000	2.538
Streptococcus sp. PG51	0.000	0.000	0.043	0.000	0.000
Streptococcus sp. PG53	0.021	0.000	0.030	0.705	0.000
Streptococcus sp. PG65	0.000	0.375	0.053	0.000	7.109
Streptococcus sp. PG71	0.000	0.821	0.037	0.000	22.155
Streptococcus sp. PG75	0.000	0.906	0.025	0.000	35.766
Staphylococcus sp. RS12*	7.685	6.672	0.022	345.050	299.580
Selenomonas ruminantium RS9	1.469	1.514	0.052	28.454	29.326
Unidentified bacterium RS11	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000
Unidentified bacterium RS13	0.000	0.000	0.034	0.000	0.000
Unidentified bacterium PG36	0.730	0.000	0.048	15.120	0.000
Unidentified bacterium PG47	0.000	0.067	0.033	0.000	2.016

หมายเหตุ * แบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส และมีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยสูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใย (Adhesion ability)

ตารางที่ 9 แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใยของ ฟางข้าว หญ้าขน และเซลลูโลสบริสุทธิ์ ของแบคทีเรียที่มีศักภาพในการย่อยสลายเยื่อใยสูง จำนวน 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 7) และมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยสูง (ตารางที่ 8) สอดคล้องกับความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใยของ ฟางข้าว หญ้าขน และเซลลูโลสบริสุทธิ์ ของ *Prevotella* sp. RS1, *F. succinogenes* RS3, *F. succinogenes* RS4, *Staphylococcus* sp. RS12 และ *Clostridium* sp. PG85 หลังบ่มเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าแบคทีเรีย *Clostridium* sp. PG85 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใยทั้งสามชนิด (ฟางข้าว หญ้าขน และเซลลูโลสบริสุทธิ์ ได้ดีที่สุด เท่ากับ 93.83, 89.58 และ 96.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน *Staphylococcus* sp. RS12 มีความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใยได้ดีเฉพาะในฟางข้าวและหญ้าขนสด คือ 92.79 และ 88.62 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่มีความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใยของเซลลูโลสบริสุทธิ์ต่ำ (11.11%) แบคทีเรียสายพันธุ์ *F. succinogenes* RS3 และ *F. succinogenes* RS4 พบว่ามีความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใยทั้งสามชนิด (ฟางข้าว หญ้าขน และเซลลูโลสบริสุทธิ์ได้ดี เช่นกัน คือ 42.34, 63.39 และ 36.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในสายพันธุ์ *F. succinogenes* RS3 และในสายพันธุ์ *F. succinogenes* RS4 คือ 35.82, 28.97 และ 29.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใยของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยเป็นคุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งในการย่อยสลายเยื่อใยของแบคทีเรีย เพราะแบคทีเรียจะต้องเข้ายึดเกาะกับอาหารเยื่อใยที่สัตว์กินเข้าไป ก่อนที่จะปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อย ขณะเดียวกันก็เจริญและเพิ่มจำนวนบนอาหารนั้น ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเป็นกลุ่มที่มีบทบาทสำคัญในการหลั่งเอนไซม์ออกมาย่อยสลายเยื่อใยที่สัตว์ได้รับ (สุริยะ, 2551; Hallwell, 1963) โดยแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยแต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการเข้ายึดเกาะกับเยื่อใยแตกต่างกัน ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์นั้นๆ ด้วย (สุริยะ และ Kobayashi, 2550; Bhat *et al.*, 1990) นอกจากนี้ความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใยของแบคทีเรียยังมีผลต่อความสามารถในปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายเยื่อใยและความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยอีกด้วย (Chen *et al.*, 2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใยของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่มีศักภาพสูงที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

Bacterail strain	Adhesion (%)		
	Rice straw	Paragrass	Cellulose powder
Prevotella sp. RS1	14.77	18.81	32.26
F. succinogenes RS3	42.34	63.39	36.37
F. succinogenes RS4	35.82	28.97	29.83
Staphylococcus sp. RS12	92.79	88.62	11.11
Clostridium sp. PG85	93.83	89.58	96.83

ความสามารถในการผลิตแก๊สของแบคทีเรีย (Gas production)

ความสามารถในการผลิตแก๊สของแบคทีเรียมีศักภาพสูง 5 สายพันธุ์ (ตารางที่ 10) คือ *Prevotella* sp. RS1, *Fibrobacter succinogenes* RS3, *F. succinogenes* RS4, *Staphylococcus* sp. RS12 และ *Clostridium* sp. PG85 เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลลูโลสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน หลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ มีปริมาณแก๊สที่ผลิตออกมา เท่ากับ 0.41, 0.34, 0.41, 0.55และ 0.33 มิลลิลิตรต่อมิลลิลตรของเชื้อนั่นแสดงให้เห็นว่า *Clostridium* sp. PG85 และ *F. succinogenes* RS3 มีการสูญเสียแก๊สจากกระบวนการหมักย่อยต่ำสุด โดยปกติการหมักย่อยของแบคทีเรียจะมีการสูญเสียคาร์บอนในรูปของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และสูญเสียไฮโดรเจนในรูปของแก๊สไฮโดรเจน ซึ่งแก๊สเหล่านี้จะถูกจุลินทรีย์ชนิดอื่นเช่น Methanogenic bacteria นำไปใช้ในการสังเคราะห์เป็นแก๊สมีเทน (สุริยะ, 2551; Latham and Wolin, 1977) ดังนั้นถ้าแบคทีเรียสามารถผลิตแก๊สได้มากแสดงว่ามีการสูญเสียคาร์บอนและไฮโดรเจนจากการหมักย่อยได้สูงด้วย

ตารางที่ 10 ผลผลิตแก๊สของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่มีศักภาพสูงที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลลูโลสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน หลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Bacterial strain	Total gas production (ml)	Gas production (ml/ml culture)
Prevotella sp. RS1	81.85	0.41
F. succinogenes RS3	67.05	0.34
F. succinogenes RS4	82.53	0.41
Staphylococcus sp. RS12	109.30	0.55
Clostridium sp. PG85	66.93	0.33

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การทดลองที่ 1 การคัดเลือกแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายเยื่อใยจากกระเพาะรูเมนกระบือปลัก

1. การคัดเลือกแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยจากกระเพาะรูเมนกระบือ ทำการแยกเชื้อจากแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 1,363 ไอโซเลท พบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยจำนวน 223 ไอโซเลท

2. การศึกษาเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่คัดเลือกไว้ จำนวน 85 สายพันธุ์ เมื่อพิจารณาความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าว พบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวที่หลากหลายโดยมีพิสัยอยู่ในช่วง 0-41.06 เปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง ซึ่งแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวได้ดีที่สุด 30 สายพันธุ์แรก มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวได้มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่แยกจากกระบือที่ได้รับฟางข้าว แบคทีเรียที่แยกจากกระบือที่ได้รับหญ้าขนส่วนใหญ่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของฟางข้าวอยู่ในช่วง 1-10 เปอร์เซ็นต์

3. การบ่งชื่อชนิดของแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคระดับโมเลกุล จำนวน 30 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้นั้นมีลำดับเบสของ 16S rDNA ใกล้เคียงกับ *Butyrivibrio fibrisolvens* จำนวน 5 สายพันธุ์, *Clostridium* sp. จำนวน 5 สายพันธุ์, *Fibrobacter succinogenes* จำนวน 3 สายพันธุ์, *Prevotella* sp. จำนวน 4 สายพันธุ์, *Streptococcus* sp. จำนวน 7 สายพันธุ์, *Staphylococcus* sp. จำนวน 1 สายพันธุ์ และ *Selenomonas ruminantium* จำนวน 1 สายพันธุ์ และพบว่าเป็นแบคทีเรียที่ยังไม่ทราบชนิดอีก 4 สายพันธุ์

การทดลองที่ 2 การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกมาได้ในหลอดทดลอง (*In vitro* study)

1. แบคทีเรียทั้ง 30 สายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยค่อนข้างหลากหลาย โดยพบแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการย่อยสลายเยื่อใยทั้งสามชนิด (RS, PG, CP) ได้ดี จำนวน 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สายพันธุ์ คือ *Prevotella* sp. RS1, *Fibrobacter succinogenes* RS3, *F. succinogenes* RS4, *Staphylococcus* sp. RS12 และ *Clostridium* sp. PG85 ซึ่งทั้ง5 สายพันธุ์ มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยสูง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยและมีความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใยของ ฟางข้าว หญ้าขน และเซลลูโลสบริสุทธิ์ที่สูงด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย *Clostridium* sp. PG85 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใยทั้งสามชนิดได้ดีที่สุด

2. แบคทีเรียมีศักยภาพสูง 5 สายพันธุ์ มีความสามารถในการผลิตแก๊ส มีปริมาตรแก๊สที่ผลิตออกมา เท่ากับ 0.41, 0.34, 0.41, 0.55และ 0.33 มิลลิลิตรต่อมิลลิลตรของเชื้อ *Clostridium* sp. PG85 และ *F. succinogenes* RS3 มีการสูญเสียแก๊สจากกระบวนการหมักย่อยต่ำสุด

ข้อเสนอแนะ

แบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกได้จากกระเพาะรูเมนของกระบือที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยสูงเหล่านี้จำเป็นต้องมีการศึกษาคุณสมบัติอื่นเพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงกระบวนการหมักย่อยในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น ความสามารถในการปลดปล่อยเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยออกนอกเซลล์ ความคงทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่าง ความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยเมื่อเจริญร่วมกับแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น หรือเมื่อนำไปใส่ในกระเพาะรูเมนของสัตว์ชนิดอื่น เป็นต้น นอกจากนี้ควรมีการศึกษาลำดับเบสของ 16S rDNA ที่มีความยาวมากขึ้นกว่าเดิม หรือมีการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนที่ผลิตเอนไซม์ต่างๆ รวมทั้งศึกษาเกี่ยวกับพลาสมิดของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยสายพันธุ์ที่น่าสนใจ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมพัฒาที่ดิน. 2551. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์การเกษตร. **การใช้อินทรีย์วัตถุปรับปรุงดิน**. แหล่งที่มา: www.ldd.go.th, 1 พฤษภาคม 2552.

กฤษ อังคณาพร. 2547. **สรีรวิทยาของกระเพาะอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง.** พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ตรีรณสาร, กรุงเทพฯ.

กองปศุสัตว์สัมพันธ์ กรมปศุสัตว์. ม.ป.ป. **การเลี้ยงกระบือ**. แหล่งที่มา: http://www.dld.go.th/service/buffalo/buffalo0.html, 17 สิงหาคม 2552.

จุรีย์รัตน์ ลีสมิทธิ์. 2550. **ระบบพันธุกรรมของจุลินทรีย์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2546. **ชีวเคมีทางสัตวศาสตร์**. พิมพ์ครั้งที่ 1 . หจก. ธนบรรณการพิมพ์, เชียงใหม่.

บุญเสริม ชีวะอิสระกุล และ บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2542. **พื้นฐานสัตวศาสตร์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. ธนบรรณการพิมพ์, เชียงใหม่.

ประสบ บูรณมานัส. 2531. **กระบือและการรักษา**. พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ.

ปรีชา อินนุรักษ์ และ ทวีพร เรืองพริ้ม. 2551. **การเพิ่มศักยภาพการใช้ฟางข้าวเป็นอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง**. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมธา วรรณพัฒน์, ศิวพร วรอนุ, ฉลอง วชิราภากร, งามนิจ นนทโส, P. Rowlinson, และ O. Sparagano. 2547. การใช้วิธีการ PCR ในการศึกษาแบคทีเรียที่ย่อยสบายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนของโคเนื้อที่ได้รับฟางข้าวเป็นอาหารหยาบหลัก. น. 92-99. *ใน* **สัมมนาวิชาการเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2547 สาขาสัตวศาสตร์/สัตวบาล "ปศุสัตว์ไทย อาหารมาตรฐานโลก".** คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สารานุกรมเสรีวิกิพิเดีย. 2551 **กระบือ**. แหล่งที่มา: http://th.wikipedia.org/wiki/กระบือ, 17 สิงหาคม 2552.

สุริยะ สะวานนท์ และ Yosuo Kobayashi. 2550. การศึกษาแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย *Butyrivibrio fibrisolvens* ที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของแกะ. **ว. สงขลานครินทร์ วทท.** 29(2): 351-361.

_____. 2551. **จุลินทรีย์วิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพด้านจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน**. ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

Atasoglu, C., C.J. Newbold, and R.J. Wallace. 2001. Incorporationof [N^{15}] ammonia by the cellulolytic ruminal bacteria *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus SY3*, and *Ruminococcus flavefaciens* 17. **Appl. Environ. Microbiol.** 67(6): 2819-2822.

Avgustin, G., A. Ramsak and M. Peterka. 2001. Systematics and evolution of ruminal species of genus *Prevotella.* **Folia Microbiol.** 46(1): 40-44.

Balasta, M.L.F. C., C.M. Peres, B.O. Jaliano, D.B. Roxas, and C.P. Villareal. 1987**.** Effect of Silica Level on Some Properties of Rice Plants and Grain. pp. 115-122. *In* Dixon, R.M. (Ed), Ruminant feeding systems utilizing fibrous agricultural residues, 1987. **Proceeding of the 7th Annual Workshop of the Australian Asian Fibrous Agic. Residues Res Network.** International Development Program of Australian Universities and Colleges Ltd., Canberra.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bhat, S., R.J. Wallance and E.R. Orskov. 1990. Adhesion of cellulolytic ruminal bacteria to barley straw. **Appl. Environ. Microbiol**. 56: 2698-2703.

Brigitte, M.-D., I. Fernandez, C. Peyron, L. Millet, G. Fonty. 2001. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. **Reprod. Nutr**. 41: 187-194.

Chen, J. and P.J. Weimer. 2001. Competition among three predominant ruminal cellulolytic bacteria in the absence or presence of non-cellulolytic bacteria. **Microbiol**. 147: 21-30.

Chen, X.L., J.K. Wang, Y.M. Wu and J.X. Liu. 2008. Effects of chemical treatment of rice straw on rumen fermentation characteristics fibrolytic enzyme activities and populations of liquid and solid-associated ruminal microbes *in vitro*. **Anim. Feed Sci. Technol.** 141: 1-14.

Chenna, R., Sugawara H., Koike T., Lopez R., Gibson T.J., Higgins D.G. and Thompson J.D. 2003. Multiple sequence alignment with the clustal series of programs. **Nucleic Acids Res.** 31(13): 3497-500.

Chowdhury, S.A. 1998. Effect of graded levels of bran supplementation on intake, nutrient digestibility, microbial N yield and growth rate of native bulls fed rice straw alone. **Asian-Aust. J. Anim. Sci**. 11: 162-170.

Collins, M.D., P.A. Lawson, A. Willmes, J.J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garacia, J. Cai, H. Hippe and J.A.E. Farrow. 1994. The phylogeny of the *clostridium*: Proposal of five new genera and eleven new species combination. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 44(4): 812-826.

Cummins, J. and M.-W. Ho. 2006. Genetically Modified Food Animals Coming. **The Codex Alimentarius Commission of The United Nations is Preparing Guidelines for Safety Assessment of Foods Derived from Recombinant-DNA Animals**. Codex Alimentarius Commission FAO Viale delle Terme di Caracalla 00100 Rome, Italy.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Doyle, P.T., C. Deven dra, and G.R. Pearce. 1986. **Rice Straw as Feed for Ruminants**. International Development program of Australian Universities and Colleges Limited (IDP), Australia.

Durand, F.C., and Fonty G. 2001. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of genotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. **Reprod. Nutr**. 41: 57-68.

Edwards, J.E., N.R. McEwan, A. J.Travis, and R.J. Wallace. 2004. 16S rDNA Library based analysis of ruminal bacterial diversity. **Antonie van Leeuwenhoek**. 86: 263–281.

El-Sayed, M.A. and T.M. El-Samni. 2006. Physical and chemical properties of rice straw ash and Its effect on the cement paste produced from different cement types. **J. King Sand Univ., Eng. Sci.** 19: 21-30.

Forano, E., and H. J. Flint. 2000. Genetically modified organisms: consequences for ruminant health and nutrition. **Ann. Zootech**. 49: 255-271.

Forsberg, C.W., T.J. Beveridge and A. Hellstrom. 1981. Cellulase and xylanase release from *Bacteroides succinogenes* and its important in the rumen environment. **Appl. Environ. Microbiol**. 42(4): 886-896.

Fondevila, M. and B.A. Dehority. 1996. Interactions between *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola* and *Ruminococcus flavefaciens* in the digestion if cellulose from forages. **J. Anim. Sci.** 74: 678-684.

Hallwell, G. 1963. The cellulolytic activity of pure strains of bacteria from rumen of the cattle. **J. Gen. Microbiol.** 32: 441-448.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hespell, R.B., D.E. Akin and B.A. Dehority . 1997. Bacteria, fungi, and protozoa of the rumen**.** pp. 59-141. *In* R.I. Mackie, B.A. White and R.E. Isaacson, eds. **Gastrointestinal Microbiol.** Chapman and Hall, New York.

Intaratham, W., and M. Wanapat. n.d. **A comparative study on gastro-intestinal tract and meat quality in ruminants**. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University.

Jin, S. and H. Chen. 2006. Structural properties and enzymeatic hydrolysis of rice straw. **Process Biochem**. 41: 1261-1264.

Joe, M.-N., S.-Y. Lim, D.-H. Kim and I.-S. Lee. 2008. Decolorization of reactive dyes by *Clostridium bifermentans* SL186 isolated from contaminated soil. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 24: 2221-2226.

Jones, R.J., R.G Megarrity. 1986. Successful transfer of DHP degrading bacteria from hawaiian goats to australian ruminants to overcome the toxicity of leucaena. **Aust. Vet. J.** 63: 259-262.

Jung, H.G., D.R. Buxton, R.D. Hatfield, and J. Ralph. 1993. **Forage Cell Wall Stucture and Digestibility**. International Symposium on Forage Cell Wall Structure and Digestibility. Madison, Wisconsin.

Kamra, D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. **Current Sci**. 89: 125-135.

Kawashima, T., W. Sumamal, P. Pholsen, R. Chithiang, and M. Kurinara. 2006. Comparative study on energy and nitrogen metabolisms between brahman cattle and swamp buffalo fed with low quality diet. **JARDQ.** 40(2): 183-188.

Keese, P. 2008. Risks from GMOs due to horizontal gene transfer. **Environ. Biosafety Res**. 7: 123-149.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kobayashi, Y. 2006. Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: Need for basic and applied science. **J. Anim. Sci**. 77: 375-385.

_____, N. Okuda, M. Matsumoto, K. Inoue, M. Wakita, and S. Hoshino. 1998. Constitutive expression of a heterologous *Eubacteium ruminantium* xylanase gene (xynA) in *Butyrivibrio fibrisolvens*. **FEMS Microbiol. Lett**. 163: 11-17.

Kocherginskaya, S.A, R. Aminov, and B.A. White. 2001. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology. **Appl. Environ. Microbiol.** 7: 119-134.

Kodjikian, L., C. Burillon, G. Lina, C. Roques, G. Pellon, J. Freney and F.N.R. Renaud. 2003. Biofilm formation on intraocular lense by clinical strain encoding the ica locus: A scaning electron microscopy study. **IOVS.** 44(10): 4382-4387.

Koike, S., S. Yoshitani, Y. Kobayashi and K.Tanaka. 2003. Fiber-associated rumen bacteria community: Its phylogeny and ecology. **Biotechnology of Lignocelluloses Degradation and Biomass Utilization**. Uni Publishers Co., Ltd. Tokyo, Japan. pp. 335-362.

_____, _____, _____ and _____. 2003. Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacteria community and PCR detection of uncultured bacteria. **FEMS Microbiol. Ecol.** 229: 23-30.

_____, Y. Hiroyoshi, and Y. Kobayashi. 2007. Validation and Application of Real-time Polymerase Chain Reaction Assays for Representative Rumen Bacteria. **Anim. Sci. J.** 78: 135-141.

Kung, L.Jr., n.d.. **Direct-Fed Microbial and Enzymes for Dairy Cows**. Department of Animal & Food Sciences University of Delaware Newark, Delaware.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lam, H. Q., Y. L. Bigot, G. Denis, V.H. Thao, and M. Delmas. 2005. Location and composition of silicon derivatives in rice straw pulp obtained by organic acid pulping. **Appita J**. 58: 214-217.

Latham, M.J. and M.J. Wolin. 1977. Fermentation of cellulose br *Ruminococcus flavefaciens* in the presence and absence of *Methanobacterium ruminantium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 34(3): 297-301.

Laukova, A. 1994. *Staphylococcus* associated with the rumen of young and wild ruminants. **Lett. Appl. Microbiol.** 19: 26-27.

Leedle, J.A.Z. 1982. Diurnal variations in bacterial numbers and fluid parameters in ruminal contents of animals fed low-or high-forage diets. **Appl. Environ. Microbiol.** 44: 402-412.

Liu, J.-R., B. Yu, F.-H. Liu, K.-J. Cheng, and X. Zhao. 2005. Expression of rumen microbial fibrolytic enzyme genes in probiotic *Lactobacillus reuteri.* **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 6769–6775.

Maillet, C.B., Y. Ribot and E. Forano. 2004. Fiber-degading systems of different strains of the genus *Fibrobacter*. **Appl. Environ. Microbiol.** 70(4): 2172-2179.

Marichemy, S. and B. Mattiasson. 2005. Rapid production of cellulose-free xylanase by solventogenic *Clostridia* from rumen. **Enzymes Microbiol. Technol.** 37: 497-504.

McLean, R.J.C., K.-J. Cheng, W.D. Gould and J.W. Costerton. 1985. Cytochemical location of urease in a rumen *Staphylococcus* sp. by electron microscopy. **Appl. Environ. Microbiol.** 49(1): 253-255.

McSweeney, C.S., B.P. Dalrymple, K.S. Gobius, P.M. Kennedy, D.O. Krause, R.I. Mackie, and G.P. Xue. 1999. The application of rumen biotechnology to improve the nutritive value of fibrous feedstuffs : pre-and post-ingestion. **Livestock Prod. Sci**. 59: 265-283.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analyt. Chem**. 31: 426-428.

Montgomery, L., B. Flesher and D. Stahl. 1988. Transfer of *Bacteroides succinogenes* (Hungate) to Fibrobacter gene. nov. as *Fibrobacter succinogenes* comb. nov. and description of *Fibrobacter intestinalis* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 38(4): 430-435.

Nelson, K.E., M.L. Thoney, T.K. Woolston, S.H. Zinder and A.N. Pell. 1998. Phenotypic and phylogenetic characterization of ruminal tannin-tolerant bacteria. **Appl. Environ. Microbiol**. 64(10): 3824-3830.

Nisbet, D.J. and S. A. Martin. 1990. Effect of Dicarboxylic acids and *Aspergillus oryzyae* fermentation extract on lactate uptake by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. **Appl. Environ. Microbiol**. 56: 3515-3518.

Ogimoto, K. and S. Imai. 1981. **Atlas of Rumen Microbiology**. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.

Otto, M. 2009. The accidental pathogen. **Nature Reviews Microbiol.** 7(8): 555-567.

Perrière, G. and M. Gouy. 1996. WWW-Query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. **Biochimie**. **78**: 364-369.

Ruangprim, T., C. Chantalakhana, P. Skunmun, P. Prucsasri and M. Wanapat. 2007. Rumen microbes and ecology of male dairy, beef cattle and buffalo. pp. 371-378. *In* **Proceeding of the 3rd Anim. Sci.** Faculty of Agriculture, Khon Kaen University. Khon Kaen, Thailand.

Russel, J.B., M.A. Cotta and D.B. Dombrowski. 1981. Rumen bacterial compettion in continuous culture: *Streptococcus bovis* versus *Megasphaera elsdenii*. **Appl. Environ. Microbiol.** 41(6): 1394-1399.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sawanon S., and Y. Kobayashi. 2006. Synergistic fribrolysis in the rumen by cellulolytic *Ruminococcus flavefaciens* and non-cellulolytic *Selenomonas ruminantium*: evidence in defined cultures. **Anim. Sci. J**. 77: 208-214.

_____. 2003**. Studies on fibrolytic gram-negative curved rods newly isolated from sheep rumen: Evaluation of their potentials and significance in fiber digestion**. M.E Thesis, Hokkaido University.

_____. 2006. **Contribution of the Anaerobic Bacterium *Selenomonas ruminantium* to Rumen Fiber Digestion**. Ph.D. Thesis, Hokkaido University, Japan.

_____, T. Shikai, S. Koike, Y. Kobayashi, and K. Tanaka. 2003. Indication of a novel group of *Selenomonas ruminantium* with high Cellulase and fiber-attaching activities from the rumen. **Biotechnology of Linocellulose Degradation and Biomass Utilization**. Uni Publishers Co., Ltd. Tokyo, Japan. pp. 363-368.

Sawar, M., Mahr-un-Nisa, S.A. Bhatti, and C.S. Ali. 1998. *In situ* ruminal digestion kinetics of forages and feed byproducts in cattle and buffalo**. Asian-Aust. J. Anim. Sci**. 11: 128-132.

Sebastian, L., V.D. Mudgal, and P.G. Nair. 1970. Comparative efficiency of milk production by Sahiwal cattle and Murrah buffalo. **J. Anim. Sci.** 30: 253-256.

Sewell, G., H.C. Aldrich, D. Williams, B. Mannarelli, A. Wilkie, B. Hespel, P.H. Smith and L.O. Ingram. 1988. Isolation and characterization of xylan-degrading strains of *Butyrivibrio fibrisolvens* from a Napier grass-fed anaerobic digester. **Appl. Environ. Microbiol.** 54(5): 1085-1090.

Sharma, V.K. and P.N. Hobson. 1985. Isolation and cellulolytic activities of bacteria from a cattle waste anaerobic digester and the properties of some *Clostridium* species. **Agric. Wastes.** 14: 173-196.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Shinkai, T., N. Matsumoto, S. Koike, S. Sawanon, Y. Kobayashi and K. Tanaka. 2003. Phylogenetic and Phenotypic Characterization of *Fibrobacter succinogenes* Starins from the Rumen. **Biotechnology of Lignocelluloses Degradation and Biomass Utilization**. Uni Publishers Co., Ltd. Tokyo, Japan. pp. 317-320.

Simonova, M., V. Stromptora, M. Marcinakova, A. Laukova, S. Vesterland, M.L. Moratalla, S.B. Ver-Cid and C. Vidal-Caron. 2006. Characterization of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. **Meat Sci.** 73: 559-564.

Sun, Y.-Z., S.-Y. Mao, W. Yao, and W.-Y. Zhu. 2008. DGGE and 16S rDNA analysis reveals a highly diverse and rapidly colonizing bacterial community on different substrates in the rumen of goats. The Animal Consortium. **Anim**. 2(3): 391–398.

Sundset, M.A., K.E. Praesteng, I.K.O. Cann, S.D. Mathiesen and R.I. Mackie. 2007. Rumen bacterial diversity in two geographically separated sub-species of reindeer. **Microbiol. Ecol.** 54: 424-438.

Suwanlee, S. and M. Wanapat. 1994. Effect of ruminal ammonia nitrogen on total volatile fatty acids, bacteria population, and digestibility in swamp buffaloes. pp. 281-283. *In* **Proceeding of the 1st Asian buffalo association congress**. Khon kaen Pub.co.Khon kaen, Thailand.

The free encyclopedia. 2009a. **Cellulose and Lignin structure**. source: www.wikimedia.com, October 2, 2009.

_____. 2009b. **Siliga structure**. source: upload. wikimedia. org. commons44cSilica. jpg. www.wikimedia.com, October 2, 2009.

Van Soest, P.J. 1987. **Nutrition ecology of the ruminant**. Cornell University, USA.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

_____. 1987. **Nutritional Ecology of The Ruminant: Ruminant Metabolism, Nutritional Strategies, The Cellulolytic Fermentation and Chemistry of Forages and Plant Fibers**. Conell University, USA.

_____. 2006. Rice straw: The role of silica and treatments To improve quality. **Anim. Feed Sci. Tech.** 130: 137–171.

_____, and L.H.P. Jones. 1968. Effect of silica in forage upon digestibility. **J. Dairy Sci**. 51: 1644-1648.

Van Wyk, L. and P.L. Steyn. 1975. Ureolytica bacteria in sheep rumen. **J. General Microbiol.** 91: 225-232.

Varel, V.H., and B.A. Dehority. 1989. Ruminal cellulolytic bacteria and protozoa from bison, cattle-bison hybrids, and cattle fed three alfalfa-corn diets**. Appl. Environ. Microbiol**. 55: 148-153.

Varga, G.A. and E.S. Kolver. 1997. Microbial and amnimal limitations of fiber digestion and utilization. **J. Nutri.** 127: 819-823.

Wallace, R.J., and C.J. Newbold. N.d.. **Microbial Feed Additives for Ruminant**. Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen, UK.

Wanapat, M. 1995. Nutritional Stratergies base on crop-residues to incease swamp buffalo production and draft efficiency on farms. *In* Wanapat M., Uriyapongson S. and Sommart K. (eds.), Proceedings of an International Workshop on Draft Animal Power. Khon kaen University, Khon kaen, Thailand.

_____, A. Ngarmsang, S. Kokhuntot, N. Nontasa, C. Wachirapakorn, G. Beakes and P. Rowlinson. 2000. A comparative study on the rumen microbial population of cattle and swamp buffalo raised under traditional village conditions in the Northeast of Thailand. **Asian-Aust. J. Anim. Sci**. 13: 918-921.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

_____, K. Sommart, C. Wachirapakorn, S. Uriyapongson, and C. Wattanachant. 1994. Recent advance in swamp buffalo nutrition and feeding. *In* **Proceeding of the 1st Asian buffalo association congress**. (eds. Wanapat M. and K. Sommart), Khon kaen, University Khon kaen, Thailand.

_____, R. Pilajun, and P. Kongmun. n.d.. Effects of Dietary Treatments on Ruminal Microorganism Diversity of Swamp Buffalo Using Molecular Techniques. Tropical Feed Resources Research and Development Center (TROFREC). *In* **Proceeding of the 3rd Anim. Sci.**. Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.

Wang, C.C., C.W. Chang, C.P. Chu, D.J. Lee, B.-V. Chang and C.S. Liao. 2003. Producing hydrogen from waste water sludge by *Closrtridium bifernmentans*. **J. Biotechnol.** 102:83-92.

Weimer, P.J. 1998. Mainipulating rumenal fermentation: a microbial ecological perspective. **J. Anim. Sci**. 76: 3114-3122.

_____, N.P.J. Price, O. Kroukamp, L. - M. Joubert, G.M. Wolfaardt, and W H. Van Zyl. 2006. Studies of the extracellular glycocalyx of the anaerobic cellulolytic bacterium ruminococcusalbus 7. **Appl. Environ. Microbiol**. 72: 7559–7566.

Whitford, M.F., R.J. Forster, C.E. Beard, J. Gong and R.M. Teather. 1998. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysi of cloned 16S rRNA gene**. Anaerobe Env iron. Microbiol.** 4: 153-163.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

สรุปขั้นตอนการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปขั้นตอนการทดลองที่ 1

การคัดเลือกแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่มีศักยภาพสูงจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก (Rumen bacteria isolation)

ขั้นตอนที่ 1 การสุ่มตัวอย่างแบคทีเรียจากกระเพาะรูเมน

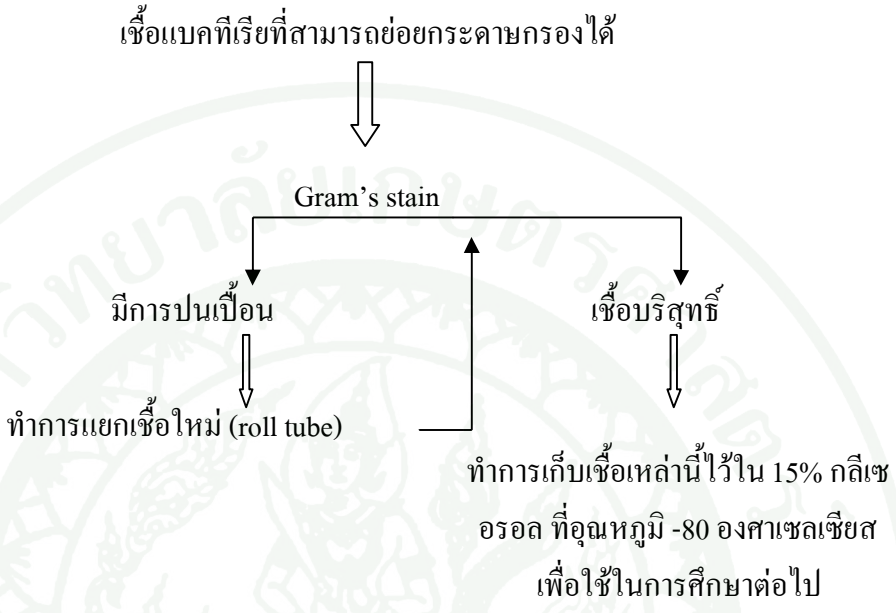
ฟางข้าวหรือหญ้าขนสด ยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร
ใส่ในถุงไนลอนแล้วนำไปแช่ในกระเพาะรูเมน
⇩ *~16 ชั่วโมง*
ล้างในสารละลายทำเจือจางภายใต้สภาวะปลอดออกซิเจน
⇩
ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีกระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman®) ขนาด 0.5×1.0 ตาราง เซนติเมตร จำนวน 2 แผ่น เป็นแหล่งของคาร์บอนในสูตรอาหารพื้นฐาน
⇩ *บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง.*
กระดาษกรองในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกย่อย

ขั้นตอนที่ 2 การแยกเชื้อแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยบริสุทธิ์

เชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งของคาร์บอน มาทำการเจือจางในสารละลายทำเจือจางภายใต้สภาวะปลอดออกซิเจน (ที่ระดับการเจือจาง 10^{-4} ถึง 10^{-6})
⇩
นำตัวอย่างเชื้อที่เจือจาง 0.2 มิลลิลตร มาทำการปลูกถ่าย (Inoculate) ลงในอาหารวุ้น ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส และเซลโลไบโอส เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้วิธีการ Roll tube
⇩ *บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง.*
แยกโคโลนีเดี่ยวใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีกระดาษกรองเบอร์ 1 เป็นแหล่งของคาร์บอน
⇩ *บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส*
คัดเลือกเอาเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยกระดาษกรองได้เท่านั้น

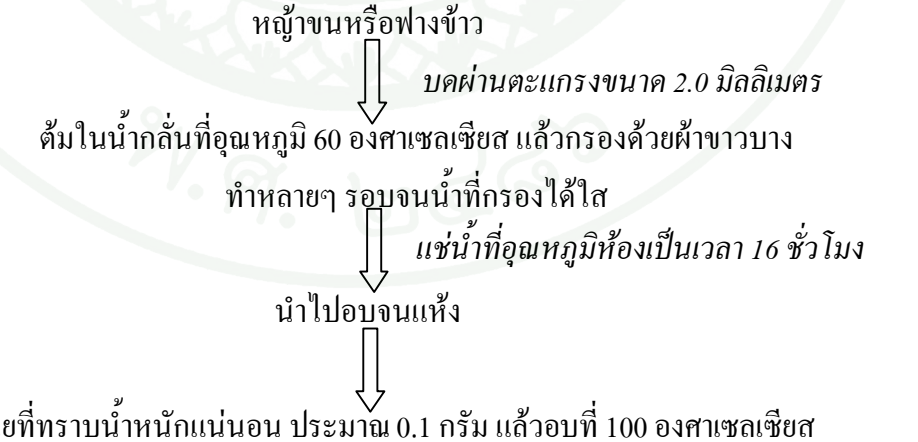
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขั้นตอนที่ 3 ตรวจสอบการปนเปื้อนและการศึกษาลักษณะรูปร่างภายนอก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยการย้อมติดสี (Gram staining)



การวัดความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใย (Fiber digestibility)

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมเยื่อใยที่ใช้ในการทดลอง



ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขั้นตอนที่ 2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์เพื่อการปลูกถ่ายเชื้อ (Inoculation)

แบคทีเรียที่เจริญในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอน (0.1% w/v)
คือ เซลโลไบโอส และ กลูโคส

↓ *บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส*
เป็นเวลานาน 16 ชม. (Log phase)

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,800×g นาน 10 นาที

↓ *ดูดส่วนของเหลวทิ้ง*

ละลายตะกอนด้วยสารละลายทำเจือจาง 1.0 มิลลิลิตร
แล้วทำการปลูกถ่ายแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงไปในหลอดทดลอง
ที่มีแหล่งคาร์บอนจากขั้นตอนที่ 1 หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร

↓ *บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส*
เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง

นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 2,800×g นาน 15 นาที

↓ *ดูดส่วนของเหลวทิ้ง*

นำตะกอนที่อยู่ในหลอดทดลองไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส จนกว่าจะชั่งได้น้ำหนักคงที่

↓

คำนวณความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใย

สูตรคำนวณ: ความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใย (%DM) = [(A-B)]/A×100

A = น้ำหนักวัตถุแห้งของเยื่อใยก่อนถูกย่อย
B = น้ำหนักวัตถุแห้งของเยื่อใยหลังถูกย่อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการวิเคราะห์ผลผลิตกรดไขมันที่ระเหยง่ายด้วยเครื่อง Gas chromatography

1. ดูดสารละลายตัวอย่าง (ที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันระเหยง่าย) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Microtube) แล้วเติมกรด Metaphophoric (เจือจาง 25% ใน 5N-H_2SO_4) ผสมให้เข้ากัน แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (overnight)

2. นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบน (supernatant) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดอันใหม่ที่มีสารละลายมาตรฐานกรด Crotonic (Internal standard) แล้วผสมให้เข้ากัน (แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

3. นำไปวิเคราะห์ผลผลิตของกรดไขมันที่ระเหยง่าย ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC-9A, Shimadzu, Japan)

วิธีการคำนวณความเข้มข้นของกรดไขมันที่ระเหยง่าย (VFA Concentration)

VFA Concentration (mM/dl) = $n \times F \times (s/S) \times 1.5 \times 1.2$

n = 2 (สำหรับ Acetate) หรือ 1 (สำหรับกรดไขมันชนิดอื่น)

F = 1.0205 (Acetate), 1.0196 (Propionate), 1.027 (Iso-butyrate), 1.0086 (Butyrate), 1.0592 (Iso-valerate), 1.0489 (Valerate)

S = (พื้นที่ใต้กราฟของ VFA ที่ต้องารคำนวณ) / (พื้นที่ใต้กราฟของกรด Crotonic ในตัวอย่าง)

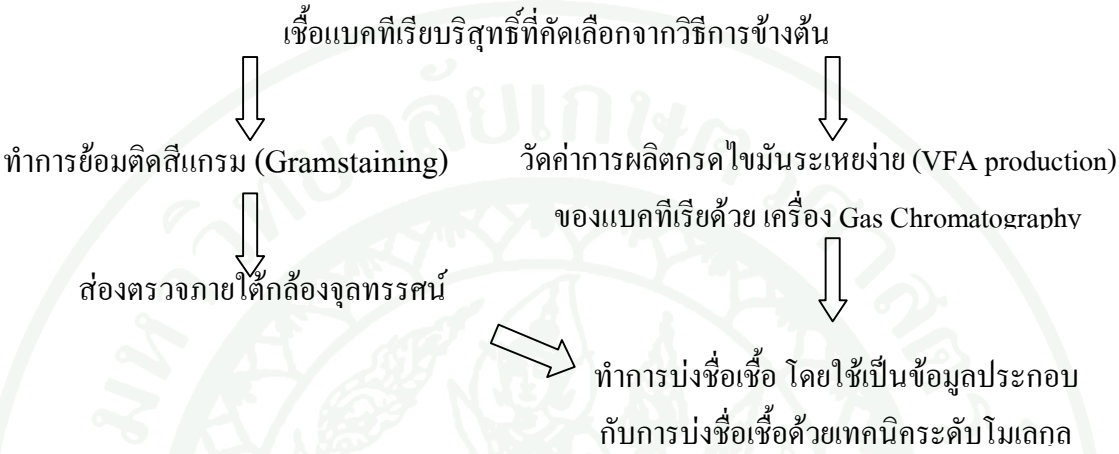
S = (พื้นที่ใต้กราฟของ VFA ที่ต้องารคำนวณใน Standard) / (พื้นที่ใต้กราฟของกรด Crotonic ในตัวอย่าง)

1.5 = อัตราส่วนของการใช้ตัวอย่างต่อกรด Crotonic ซึ่งใช้ที่ 1:1 (ถ้าเป็นการหา VFA ในกระเพาะรูเมน จะใช้อัตราส่วนของ ตัวอย่าง: กรด Crotonic = 1:1 ตัวเลขนี้จะใช้ 2.0)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

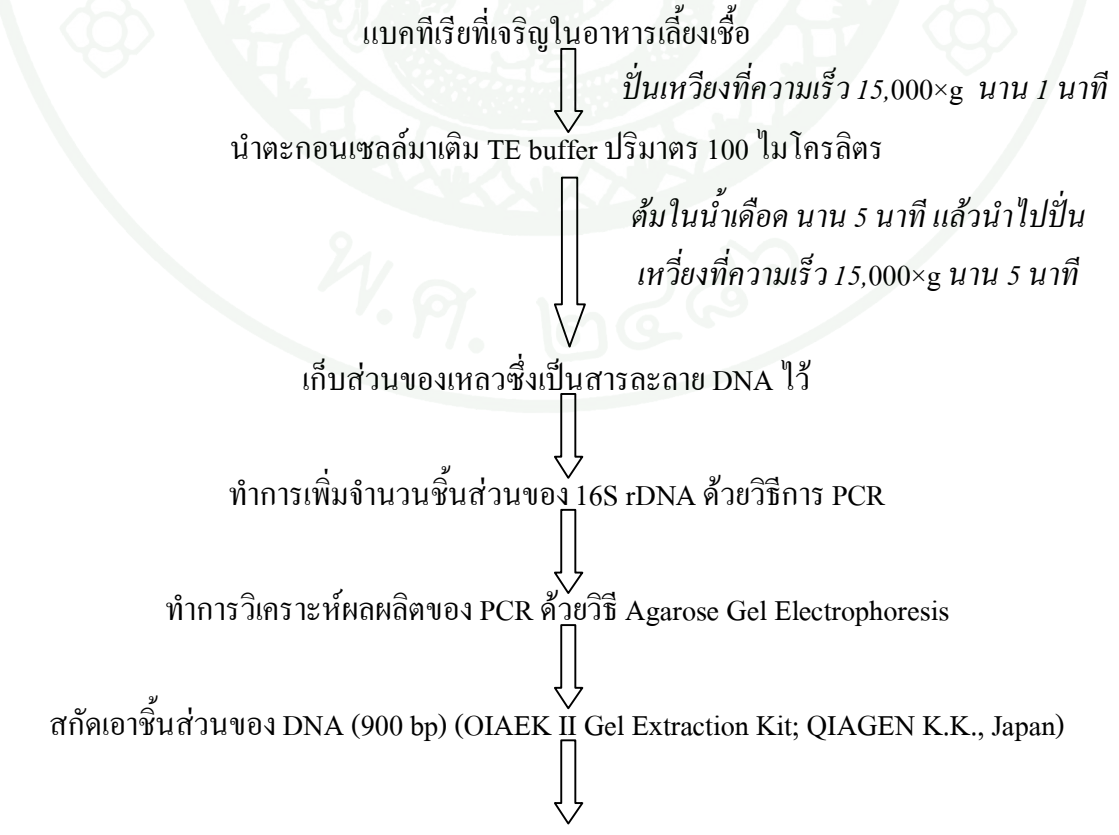
การบ่งชื่อเชื้อแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย

ขั้นตอนที่ 1 การบ่งชื่อเชื้อด้วยวิธีดั้งเดิม(Conventional methods)



ขั้นตอนที่ 2 การบ่งชื่อเชื้อด้วยวิธีการทางด้านชีวโมเลกุล (Molecular technique)

การหาลำดับเบสบางส่วนของ 16S rDNA



ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำชิ้นส่วน DNA ที่ได้มาทำการโคลนเข้าไปใน pTZ57R/T Vector แล้วนำเข้าสู่เซลล์ให้อาศัยของ *E. coli* HIT-JM109 (InsTAclone™ PCR Cloning Kit)

⇩

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับเบสของ 16S rDNA (16S rDNA sequencing)

⇩

นำลำดับเบส 16S rDNA ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของแบคทีเรียที่ทราบชนิดใน GenBank

⇩

นำเอาลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่อยู่ใน GenBank มาทำการ Multialigment โดยใช้โปรแกรม Clustal X และทำการเขียนแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

สรุปขั้นตอนการทดลองที่ 2

การวัดความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยของเชื้อบริสุทธิ์ (Fiber digestibility)

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมแหล่งเยื่อใยที่ใช้ในการทดลอง

เซลลูโลสบริสุทธิ์ (Sigmacell 20; Sigma®) ฟางข้าว และหญ้าขน โดยฟางข้าวหรือหญ้าขน

⇩ *บดผ่านตะแกรงขนาด 2.0 มิลลิเมตร*

ต้มในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง ทำหลายๆ รอบจนน้ำที่กรองได้ใส

⇩ *แช่น้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 16 ชั่วโมง*

นำไปอบจนแห้ง

⇩

ชั่งเยื่อใยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ประมาณ 0.1 กรัม แล้วอบที่ 100 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ ใส่ในหลอดเลี้ยงเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วเติมอาหารสูตรพื้นฐานที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนอื่นอยู่เลย ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขั้นตอนที่ 2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์และการปลูกถ่ายเชื้อ (Inoculation)

แบคทีเรียที่เจริญในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอน (0.1% w/v)
คือ เซลโลไบโอส และ กลูโคส

บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส
เป็นเวลานาน 16 ชม. (Log phase)

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,800×g นาน 10 นาที

ดูดส่วนของเหลวทิ้ง

ละลายตะกอนด้วยสารละลายทำเจือจาง 1.0 มิลลิลิตร
แล้วทำการ Inoculate แบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงไปในหลอดทดลอง
ที่มีแหล่งคาร์บอนจากขั้นตอนที่ 1 หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร

บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส
เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง

นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 2,800×g นาน 15 นาที

ดูดส่วนของเหลวทิ้ง

นำตะกอนที่อยู่ในหลอดทดลองไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส จนกว่าชั่งได้น้ำหนักคงที่

คำนวณความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใย

สูตรคำนวณ: ความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใย (%DM) = [(A-B)]/A×100

A = น้ำหนักวัตถุแห้งของเยื่อใยก่อนถูกย่อย
B = น้ำหนักวัตถุแห้งของเยื่อใยหลังถูกย่อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวัดความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใย (Intracellular enzyme activity)

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

แบคทีเรียที่เจริญในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอน (0.1% w/v)
คือ เซลโลไบโอส และ กลูโคส

↓ *บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส*
เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมง (Log phase)

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 20,000×g นาน 10 นาที

↓ *ดูดส่วนของเหลวทิ้ง*

กำจัดน้ำตาลที่ตกค้างโดยล้างตะกอนด้วยสารละลาย 50 mM Phosphate buffer (pH 6.8) 2 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 20,000×g นาน 10 นาที จากนั้นเทส่วนของเหลวทิ้ง (ทำ 2 ครั้ง)

↓

ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 50 mM Phosphate buffer (pH 6.8) 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultrasonic (UD-201, TOMY, Japan) ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที โดยมีขั้นตอนในการทำให้เซลล์แตกดังนี้ (ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

Sonication	■ □ ■ □ ■ □ ■ □ ■ □ ■ □ ■ □ ■
Time	≥10 min

■ หมายถึง ทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก ด้วยเครื่อง Sonicatot เป็นเวลา 1 นาที

□ หมายถึง เว้นระยะเพื่อระบายความร้อนจากการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก อย่างน้อย 1 นาที

↓

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 20,000×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อแยกเอาสารละลายไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย (Intracellular activity) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Spectromic genesys 5) ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ตามวิธีของ Millier (1959)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขั้นตอนที่ 2 การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ Cellulase และ Xylanase ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย (Intracellular activity)

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ใช้ Carboxyl methyl-cellulose (1% CMC in Streized 50 mM phosphate buffer) (Sigma) เป็นสารละลายตั้งต้น และใช้ 20 mM D-glucose เป็นสารละลายมาตรฐาน

ตารางที่ 2 ค่ามาตรฐานของสารละลายกลูโคส

Tube No.	20 mM glucose (μl)	Phosphate buffer (μl)	Concentration of glucose (nMoles/ml or tube)
1	0	200.0	0.0
2	12.5	187.5	250.0
3	25.0	175.0	500.0
4	37.5	162.5	750.0
5	50.0	150.0	1000.0

หมายเหตุ ทำ standard จำนวน 2 ซ้ำ ในทุกระดับความเข้มข้น (รวม 10 tubes)

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเซลลูเลสของสารละลายตัวอย่าง

Tube No.	CMC solution (μl)	Phosphate buffer (μl)	Supernatant (μl)	Incubation time (min)
1	100	0	100	0 °C, 0 min
2	100	0	100	0 °C, 0 min
3	100	0	100	0 °C, 0 min
4	100	0	100	38 °C, 30 min
5	100	0	100	38 °C, 30 min
6	100	0	100	38 °C, 30 min
7	0	100	100	38 °C, 30 min

หมายเหตุ - นำหลอดที่ 1, 2 และ 3 แช่ในน้ำแข็งทันที

- นำหลอดที่ 4, 5, 6 และ 7 แช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส

1. ใช้หลอดขนาด 15 มิลลิลิตร ยาวประมาณ 10 เซนติเมตร

2. ทุกขั้นตอนต้องกระทำภายใต้อุณหภูมิ ต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส โดยแช่ในน้ำแข็ง

3. หลอดตัวอย่างที่ 1, 2 และ 3 เมื่อใส่ เอนไซม์จากตัวอย่าง (Supernatant) แล้วต้องแช่ในน้ำแข็งทันที ซึ่งใช้เป็นหลอดควบคุมว่าก่อนที่เอนไซม์จากตัวอย่างจะทำงาน ในสารละลาย CMC มีน้ำตาลปริมาณเท่าไร

4. หลอดที่ 4, 5, 6 และ 7 เมื่อใส่ Supernatant แล้วต้องนำลงไปในอ่างน้ำอุ่นที่ 38 องศาเซลเซียส โดยทันที แล้วจับเวลา 30 นาที แล้วนำลงแช่ในน้ำแข็งทันที ซึ่งในหลอดที่ 7 ต้องการตรวจว่าในฟอสเฟต (Phosphate) มีน้ำตาลกลูโคสปริมาณเท่าไร

5. จากนั้นเติมสารละลาย 500 µl DNS (Solution A+B) ลงในหลอดทดลองทุกหลอดทันที (ที่อุณหภูมิห้อง)

6. นำหลอดทั้งหมดไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

7. นำไปวัดหาความเข้มข้นของกลูโคสด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส ใช้วิธีการเดียวกับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส แต่ใช้ Xylan (1% Xylan in Streized 50 mM phosphate buffer) (Sigma) เป็นสารละลายตั้งต้น และใช้ 20 mM D-Xylose เป็นสารละลายมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการเตรียมสารละลาย DNS (DNS solution A+B)

1. สารละลาย A (solution A)

1) เตรียมสารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์ DNS (3.5-dinitrosalicilic acid mw = 228.12; w/v) โดยละลาย DNS 1.76 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 176 มิลลิลิตร

2) เตรียมสารละลาย 4.5 เปอร์เซ็นต์ NaOH โดยละลาย 2.7 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 60 มิลลิลิตร

3) ทำการละลาย Pottasium sodium tartroto tetrahydrate ในสารละลาย ข้อ 1)

4) นำสารละลาย ข้อ 2) และ ข้อ 3) ผสมให้เข้ากัน

2. สารละลาย B (solution B)

1) เตรียมสารละลาย 10 เปอร์เซ็นต์ NaOH โดยละลาย NaOH 1 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2) ทำการละลาย Phenol 2 กรัม (สารเคมีอันตราย ควรระมัดระวังในการใช้) ในสารละลาย ข้อ 1) ปริมาตร 4.4 มิลลิลิตร

3) ปรับสารละลาย ข้อ 2) ให้ได้ 20 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

4) ทำการละลาย $NaHCO_3$ ในสารละลาย ข้อ 3) ปริมาตร 6.9 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวัดความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใย (Adhesion ability)

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมแหล่งเยื่อใยที่ใช้ในการทดลอง

ทำการชั่งเซลลูโลสบริสุทธิ์ (Sigmacell 20) ฟางข้าว หรือหญ้าขน (ที่เตรียมจากการทดลองที่ 2.1) 0.1 กรัม ใส่หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร

⇩

ขั้นตอนที่ 2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

แบคทีเรียที่เจริญในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอน (0.1% w/v) คือ เซลโลไบโอส และ กลูโคส

⇩ *บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 16 ชั่วโมง (Log phase)*

วัดค่าความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น (Optical density; OD_{660})

⇩

ทำการย้ายแบคทีเรียที่ทราบค่า $OD_{เริ่มต้น}$ ใส่ในหลอดที่มีเยื่อใยชนิดต่างๆ อยู่ (ภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน)

⇩ *บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที*

กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่มีรูขนาด 20-30 ไมโครเมตร

⇩

นำของเหลวที่ผ่านการกรอง ไปวัดค่า OD_{660} หลังการบ่มเชื้อ ($OD_{หลัง}$)

สูตรคำนวณ: ความสามารถในการยึดเกาะบนเยื่อใย (%) = $[(OD_{เริ่มต้น} - OD_{หลัง})/ OD_{เริ่มต้น}]\times 100$

$OD_{เริ่มต้น}$ = ค่าความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นก่อนการบ่มเชื้อ

$OD_{หลัง}$ = ค่าความหนาแน่นของเซลล์หลังการบ่มเชื้อ 30 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวัดความสามารถในการผลิตแก๊สของแบคทีเรีย (Gas production)

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

แบคทีเรียที่เจริญในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอน (0.2% w/v)
คือ เซลโลไบโอส และ กลูโคส ปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตร

↓ *บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส*
เป็นเวลานาน 16 ชม. (Log phase)

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 20,000×g นาน 10 นาที

↓ *ดูดส่วนของเหลวทิ้ง*

ละลายตะกอนแบคทีเรียแต่ละหลอดด้วยสารละลายทำเจือจาง 1.0 มิลลิลิตร
แล้วนำมารวมในหลอดเดียว

ขั้นตอนที่ 2 การเตรียมเครื่องวัดค่าการผลิตแก๊สและการปลูกถ่ายเชื้อ (Inoculation)

ชั่ง เซลลูโลสบริสุทธิ์ (Sigmacell 20) 2 กรัม ใส่ใน Reactor ขนาด 250 มิลลิลิตร
ของเครื่องค่าการผลิตแก๊ส (ทำตัวอย่างละ 4 ซ้ำ)

↓

เติมอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน 200 มิลลิลตรต่อ Reactor
ลงใน Reactor จากข้อ 1) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน

↓

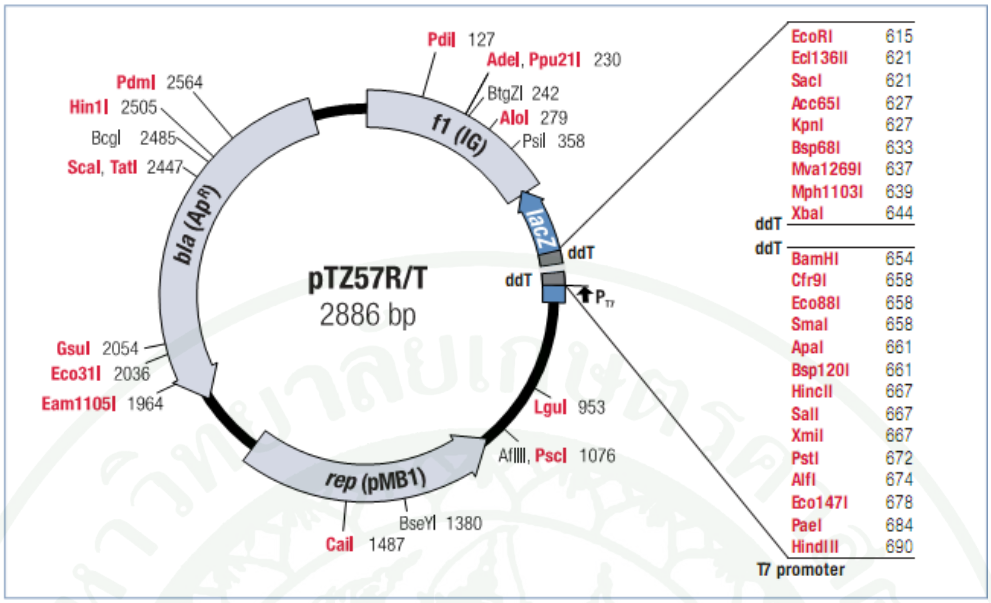
ทำการปลูกถ่ายเชื้อ จากข้อ 2.4.2 ลงใน Reacter 1 มิลลิลิตรต่อขวดปฏิกิริยา
ปิดด้วยฝาขวดให้สนิท

บันทึกข้อมูลค่าความดัน
จากการผลิตแก๊สทุกๆ 1

↓ *บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส*
ในเครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (Shake incubater)
ที่ความเร็ว 150 รอบ

คำนวณปริมาณแก๊สที่ผลิตหลังการบ่มเชื้อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ 1 Restriction map of vector pTZ57R/T (Fermentas)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

ลำดับเบสของ 16S rDNA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลำดับเบสของ 16S rDNA (16S rDNA sequence) ของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของกระบือปลัก

1. >RS1

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGGAAGGTCCGGGCGTTATCCGGATTTATTG
GGTTTAAAGGGAGCGCAGGCTGATGATTAAGCGTGACGTGAAATGTAGCCGCTCAAC
GGCTGAACTGCGTCGCGAACTGGTTATCTTGAGTGAGTTCGATGTTGGCGGAATTCGT
GGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCACGAAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCCAA
CAAGGCCTTTACTGACGCTAAAGCTCGAAGGTGCGGGTATCGAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCGCACGGTAAACGATGGATGCCCGCTGTTTGCGATATACTGTGAGCG
GCCAAGAGAAATCGTTAAGCATCCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACT
CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAATTCGATGA
TACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAACTGCAGCGGACGGATACAGAGATGTTGAC
TCCCTTCGGGGCCGCTGTGGAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGT
GTCGGCTTAAGTGCCATAACGAGCACAACCCTTTTCATTAGTTGCCATCAGGTAATGC
TGGGCACTCTGGTGATACTGCCACCGTAAGGTGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
ATCAGCACGGCCCTTACGTCCGGGGCTACACACGTGTTACAATGGGGGGTACAGAAG
GCGGGATCAATGCAAATTGGTTCAAATCTTAAAAGCCCTCCTCAGTTCGGATTGGGG
TCTGCAACCCGACCCCATGAAGCTGGATTCGCTAGTAACCGCGCATCAGCCATGGCG
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT

2. >RS3

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAGGGGTGCAAGCGTTGTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGGGAGCGTAGGCGGAGATTCAAGCGGATTGTACAATCCCGGGGCCCAA
CCCCGGCTCTGCAGTCCGAACTGGATTTCTTGGATAGTTCAGGGGCAGGCGGAATTC
CTGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGATGGCGAAGGCAGC
CTGCTGGGGACTTATCGACGCTGAGGCTCGAAAGTGCGGGTAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGACCGCACCGTAAACAATGCATACTGGGTGTCCGGGGGTTCCCCCGG
GTACCGTAGCCAACGCGTTAAGTATGCCGCCTGGGGAGTACGTACGCAAGTATGAAA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG
CAACGCGCAGAACCTTACCAGGGTTTGACATGGGAACGCCGCGGCGAGAGATCGCC
GTTTTGCAGCAATGCAACGTTCCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTTTCCAGTTGCCACCC
GCAAGGGGGCCCTCTGGAGAGACTGCCGGGGACAACCCGGAGGAAGGTGTGGATGA
CGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTAC
AATGGGTCGCAACGCCGCGAGGCGGAGCCAATCCTCAAAGCCGTCCTCAGTTCGGAT
CGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTGGGTCAGCAC
ACCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGCACACACCGCCCGT

3. >RS4

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGAGGGGTGCAAGCGTTGTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGGGAGCGTAGGCGGAGATTCAAGCGGATTGTACAATCCCGGGGCCCAA
CCCCGGCTCTGCAGTCCGAACTGGATCTCTTGGATAGTTCAGGGGCAGGCGGAATTC
CTGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGATGGCGAAGGCAGC
CTGCTGGGGACTCATCGACGCTGAGGCTCGAAAGTGCGGGTAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCGCACCGTAAACAATGCATACTGGGTGTCCGGGGGTTCCCCCG
GGTACCGTAGCCAACGCGTTAAGTATGCCGCCTGGGGAGTACGTACGCAAGTATGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGTTTGACATGGGAACGCCGCGGCGAGAGATCGC
CGTTTTGCAGCAATGCAACGTTCCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTTTCCAGTTGCCACC
CGCAAGGGGGCCCTCTGGAGAGACTGCCGGGGACAACCCGGAGGAAGGTGTGGATG
ACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGT
ACAATGGGTCGCAACGCCGCGAGGCGGAGCCAATCCTCAAAGCCGTCCTCAGTTCGG
ATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTGGGTCAGC
ACACCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGCACACACCGCCCGT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. >RS6

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAAGGTCCGGGCGTTATCCGGATTTATTG
GGTTTAAAGGGAGCGCAGGCTGATGATTAAGCGTGACGTGAAATGTAGCCGCTCAAC
GGCTGAACTGCGTCGCGAACTGGTTATCTTGAGTGAGTTCGATGTTGGCGGAATTCGT
GGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCACGAAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCCAA
CAAGGCCTTTACTGACGCTAAAGCTCGAAGGTGCGGGTATCGAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCGCACGGTAAACGATGGATGCCCGCTGTTTGCGATATACTGTGAGCG
GCCAAGAGAAACCGTTAAGCATCCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAACT
CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAACTCGATGA
TACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAACTGCAGCGGACGGATACAGAGATGTTGAC
TCCCTTCGGGGCCGCTGTGGTGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGT
GTCGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCCTTTTCATTAGTTGCCATCAGGTGATGC
TGGGCACTCTGGTGATACTGCCACCGTAAGGTGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
ATCAGCACGGCCCTTACGTCCGGGGCTACACACGTGTTACAATGGGGGGTACAGAAG
GCGGGATCAATGCAAATTGGTTCAAATCTTAAAAGCCCTCCTCAGTTCGGATTGGGG
TCTGCAACCCGACCCCATGAAGCTGGATTCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCG
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGCACACACCGCCCGT

5. >RS7

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGGAAGGTCCGGGCGTTATCCGGATTTATTG
GGTTTAAAGGGAGCGCAGGCTGATGATTAAGCGTGACGTGAAATGTAGCCGCTCAAC
GGCTGAACTGCGTCGCGAACTGGTTATCTTGAGTGAGTTCGATGTTGGCGGAATTCGT
GGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCACGAAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCCAA
CAAGGCCTTTACTGACGCTAAAACTCGAAGGTGCGGGTATCGAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCGCACGGTAAACGATGGATGCCCGCTGTTTGCGATATACTGTGAGCG
GCCAAGAGAAATCGTTAAGCATCCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAGACT
CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAATTCGATGA
TACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAACTGCAGCGGACGGATACAGAGATGTTGAC
TCCCTTCGGGGCCGCTGTGGAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

GTCGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCCTTTTCATTAGTTGCCATCAGGTGATGC
TGGGCACTCTGGTGATACTGCCACCGTAAGGTGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
ATCAGCACGGCCCTTACGTCCGGGGCTACACACGTGTTACAATGGGGGGTACAGAAG
GCGGGATCAATGCAAATTGGTTCAAATCTTAAAAGCCCTCCTCAGTTCGGATTGGGG
TCTGCAACCCGACCCCATGAAGCTGGATTCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCG
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT

6. >RS9

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGGGAGCGCAGGCGGGAAAGCAAGTCAGTCTTAAAAGTGCGGGGCTCAA
CCCCGTGATGGGATTGAAACTGTCTTTCTTGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGAATTCC
TAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCT
TTCTGGACTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTAGGAGGTATCGACCCCT
TCTGTGCCGGAGTTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTCG
ACGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATTGAGTGAAAGACCTAGAGATAG
GTCCCTCTCTTCGGAGACACGAAAACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCATTTGTTGCCAGCA
CGTTAAGGTGGGAACTCAAATGAGACTGCCGCGGACAACGCGGAGGAAGGCGGGGA
TGACGTCAAGTCATCATGCCCCTTATGTCCTGGGCTACACACGTACTACAATGGGAT
GGACAGAGAGCAGCGACCCCGCGAGGGCAAGCGAACCCCATAAACCATCTCCCAGT
TCGGATTGCAGGCTGCAACCCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCTGGT
CAGCATACAGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGCACACACCGCCCGT

7. >RS10

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTACTG
GGTGTAAAGGAAGCGTAGGCGGTTTTACAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAAC
TCCGGTATTGCATTGGAAACTGTAGAACTAGAGTGTCGGAGGGGTAAGTGGAATTCC

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

TAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCT
TACTGGACGATTACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGCTTCCATAGGGAG
TCGGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTCTTGACAAAGTATGTAATGT
ACTCTTCTTTCGGGACAAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTAGCCAGCAAT
TCGGTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCCGGGTGAACCGGGAGGAGGGTGGGGATGA
CGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAA
CAAAGGGAAGCAATCATGTGAGTGTGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTCAGTTCGG
ATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGA
ATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGCACACACCGCCCGT

8. >RS11

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTG
GGTGTAAAGGGAGCGTAGACGGCCATGCAAGTCTGAAGTGAAAGCTCGGGGCTCAA
CCCCGGAACTGCTTTGGAAACTGTAAGGCTGGAGTGCAGGAGAGGTAAGCGGAATTC
CTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGAGGCGAAGGCGGC
TTACTGGACTGTAACTGACGTTGAGGCTCGAAGGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCGGTAAACGATGATCACTAGGTGTTGGCAAGCATAGCTTG
TCGGTGCCGCAGCAAACGCAATAAGTGATCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
AAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGAGATCCAGTTGAATACAGGGTAATGCC
TGTAGTCTTCGGACAACTGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTAGCCAGCAAGT
AAAGTTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCCGGGATAACCGGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGTCGTAAA
CAAAGGGAAGCAATGGAGCGATCCGGAGCAAATCCCAGAAATAACGACTCAGTTCG

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

GATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAG
CATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGT

9. >RS12

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAAC
CGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTC
CATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC
TTTCTGGTCTGTAACTGACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCC
CTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC
GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTCTGACCCCTCTAGAGATAG
AGTTTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAAGCTTAGTTGCCATC
ATTAAGTTGGGCACTCTAAGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAAT
ACAAAGGGTAGCGAAACCGCGAGGTCAAGCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCG
GATTGTAGTCTGCAACTCGACTATATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAG
CATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGT

10. >RS13

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTAATAAGTTTGAAGTTAAAGGCAGTGGCTTAAC
CATTGTTCGCTTTGGAAACTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCCA
TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCT
CTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGCCCTTTCCGGGGCTT
AGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAAGTACGCTCGCAAGAGTGAA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCTAAGCTTGACATCCCACTGACCTCTCCCTAATCGGAG
ATTTCCCTTCGGGGACAGTGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCTTTAGTTGCCAGCATT
AAGTTGGGCACTCTAGAGGGACTGCCGAGGATAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCCTTATGCTTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGGTAC
AGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGA
TTGTAGGCTGAAACTCGCCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCGCAGATCAGAA
TGCTGCGGTGAATGCGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGT

11. >RS15

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCTAGCGTTATCCGGAATTACTG
GGCGTAAAGGGTGCGTAGGTGGTTTTTTAAGTCAGAAGTGAAAGGCTACGGCTCAAC
CGTAGTAAGCTTTTGAAACTAGAGAACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTAGAATTCCT
AGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAATACCAGTAGCGAAGGCGGCTC
TCTGGACTGTAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAGGTGTCGGGGGTTACCCCCCTC
GGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTACTCCGCCTGGGAAGTACGCTCGCAAGAGTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTTAATTCGAG
GCAACGCGAAGAACCTTACCTAAGCTTGACATCCCACTGACCTCTCCCTAATCGGAG
ATTTCCCTTCGGGGACAGTGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCTTTAGTTGCCAGCATT
AAGTTGGGCACTCTAGAGGGACTGCCGAGGATAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCCTTATGCTTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGGTAC
AGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGA
TTGTAGGCTGAAACTCGCCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCGCAGATCAGAA
TGCTGCGGTGAATGCGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

12. >RS16

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCTAGCGTTATCCGGAATTACTG
GGCGTAAAGGGTGCGTAGGTGGTTTTTTAAGTCAGAAGTGAAAGGCTACGGCTCAAC
CGTAGTAAGCTTTTGAAACTAGAGAACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTAGAATTCCT
AGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAATACCAGTAGCGAAGGCGGCTC
TCCGGACTGTAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAGGTGTCGGGGGTTACCCCCCTC
GGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTACTCCGCCTGGGAAGTACGCTCGCAAGAGTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCTAAGCTTGACATCCCACTGACCTCTCCCTAATCGGAG
ATTTCCCTTCGGGGACAGTGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCTTTAGTTGCCAGCATT
AAGTTGGGCACTCTAGAGGGACTGCCGAGGATAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCCTTATGCTTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGGTAC
AGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGA
TTGTAGGCTGAAACTCGCCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCGCAGATCAGAA
TGCTGCGGTGAATGCGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGT

13. >PG21

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTAATAAGTCTGAAGTTAAAGGCAGTGGCTTAAC
CATTGTTCGCTTTGGAAACTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCCA
TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCT
CTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGCCCTTTCCGGGGCTT
AGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGATGCTATTCCTAGAGATAGGA
AGTTTCTTCGGAACATCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAG
TTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAAC
GAGTCGCGAGTCGGTGACGGCAAGCAAATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTCGGATTG
TAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGC
CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT

14. >PG36

ACGGGCGGTGTGTGCAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGCCATGGCTGATG
CGCGATTACTAGCGAATCCAGCTTCACGGAGTCGGGTTGCAGACTCCGATCCGAACT
GAGATGGGTTTTAAAGATCTGCATCCTGTCGCCAGGTAGCTTCCTTCTGTACCCACCA
TTGTAACACGTGTGTCGCCCCGGACGTAAGGGCCGTGCTGATTTGACGTCATCCCCCC
CTTCCTCTCACCTTGCGGTGGCAGTCCCGCCAGAGTCCCCACCATTGCGTGCTGGTAA
CTGACGGCAAGGGTTGCGCTCGTTATGGCACTTAAGCCGACACCTCACGGCACGAGC
TGACGACAACCATGCAGCACCTCGACAGAAGCCCCGAAGGGCGTTTGCGTCTCCGCA
TCCTTCCTCTGCCGTTCGAGCCCGGGTAAGGTTCCTCGCGTATCATCGAATTAAACCA
CATGTTCCTCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTC
GTACTCCCCAGGTGGATGACTTATCGCTTTCGCTTGGCCACCGACTGTATGCCGCCGG
CGGTTAGTCATCATCGTTTACTGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGATCC
CCACGCTTTCGTGCCTCAGCGTCAGTTACCGCTTCGTGAGGTGTCTTCACAATCGGCG
TTCTGTGTAATATCTATGCATTTCACCGCTACACTACACATTCCCCCCACGGCAACGG
CACTCCAGACAACCAGTATCAACTGCACTTCCCGCGTTAAGCGCGGGCATTTCACAG
CTGACTTAATCGTCCGCCTACGCACCCTTTAAACCCAATAAATCCGGATAACGCTCGC
ATCCTCCGTATTACCGCGGCGGCTGGCAC

15. >PG37

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGCTTAATAAGTCTGAAGTTAAAGGCAGTGGCTTAA
CCATTGTTCGCTTTGGAAACTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCC

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCT
CTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGCCCTTTCCGGGGC
TTAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGATGCTATTCCTAGAGATAG
GAAGTTTCTTCGGAACATCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCCATCATTA
AGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACG
TCAAATCCTCATGCCCTTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACACTGGTTGGTACAC
TGAGTCGTGAGTCGGTGACGGCAAGCAAATTTTTTAAAGCCAATCTCAGTTCGGATT
GTAGGCTGCATCTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCTCGGATCAGCCCG
CCGCGGTGAATAGGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT

16. >RS46

GTGCCAGCCTCCGCGGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTACTG
GGTGTAAAGGGAGCGTAGGCGGTTTTACAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAAC
TCCGGTATTGCATTGGAAACTGTAGAACTAGAGTGTCGGAGGGGTAAGTGGAATTCC
TAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCT
TACTGGACGATTACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGCTTCCATAGGGAG
TCGGTGCCGCAGCAAACGCAATAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCCACTGACAAAGTATGTAATGT
ACTCTTCCCTCGGGACAGTGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTAGCCAGCAAT
TCGGTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCCGGGTGAACCGGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATTTGGGCCACACACGTGCTACAATGGCGTAAA
CAAAGGGAAGCAATCACGTGAGTGTGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTCAGTTCGG

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGA
ATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGT

17. >PG47

ACGGGCGGTGTGTGCAAGCCCGGGAACGTATTCACCGCGCCATGGCTGATGC
GCGATTACTAGCGAATCCAGCTTCACGGAGTCGGGTTGCAGACTCCGATCCGAACTG
AGATGGGTTTTAAAGATCTGCATCCTGTCGCCAGGTAGCTTCCTTCTGTACCCACCAT
TGTAACACGTGTGTCGCCCCGGACGTAAGGGCCGTGCTGATTTGACGTCATCCCCCC
CTTCCTCTCACCTTGCGGTGGCAGTCCCGCCAGAGTCCCCACCATTGCGTGCTGGTAA
CTGACGGCAAGGGTTGCGCTCGTTATGGCACTTAAGCCGACACCTCACGGCACGAGC
TGACGACAACCATGCAGCACCTCGACAGAAGCCCCGAAGGGCGTTTGCGTCTCCGCA
TCCTTCCTCTGCCGTTCGAGCCCGGGTAAGGTTCCTCGCGTATCATCGAATTAAACCA
CATGTTCCTCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTC
GTACTCCCCAGGTGGATGACTTATCGCTTTCGCTTGGCCACCGACTGTATGCCGCCGG
CGGTTAGTCATCATCGTTTACTGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGATCC
CCACGCTTTCGTGCCTCAGCGTCAGTTACCGCTTCGTGAGGTGTCTTCACAATCGGCG
TTCTGTGTAATATCTATGCATTTCACCGCTACACTACACATTCCCCCCACGGCAACGG
CACTCCAGACAACCAGTATCAACTGCACTTCCCGCGTTAAGCGCGGGCATTTCACAG
CTGACTTAATCGTCCGCCTACGCACCCTTTAAACCCAATAAATCCGGATAACGCTCGC
ATCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC

18. >PG51

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTAATAAGTCTGAAGTTAAAGGCAGTGGCTTAAC
CATTGTTCGCTTTGGAAACTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCCA
TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCT
CTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGCCCTTTCCGGGGCTT
AGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGATGCTATTCCTAGAGATAGGA
AGTTTCTTCGGAACATCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA
GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAG
TTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAAC
GAGTCGCGAGTCGGTGACGGCAAGCAAATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTCGGATTG
TAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGC
CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT

19. >PG53

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGCCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTAATAAGTCTGAAGTTAAAGGCAGTGGCTTAAC
CATTGTTCGCTTTGGAAACTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCCA
TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCT
CTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGCCCTTTCCGGGGCTT
AGTGCCGCAGCCAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGATGCTATTCCTAGAGATAGG
AAGTTTCTTCGGAACATCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTG
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAA
GTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
CAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAA
CGAGTCGCGAGTCGGTGACGGCAAGCAAATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTCGGATT
GTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACG
CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

20. >PG58

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCTAGCGTTATCCGGAATTACTG
GGCGTAAAGGGTGCGTAGGTGGTTTTTTAAGTCAGAGGTGAAAGGCTACGGCTCAAC
CGTAGTAAGCTTTTGAAACTAGAGAACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTAGAATTCCT
AGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAATACCAGTAGCGAAGGCGGCTC
TCTGGACTGTAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAGGTGTCGGGGGTTACCCCCCTC
GGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTACTCCGCCTGGGAAGTACGCTCGCAAGAGTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCTAAGCTTGACATCCCATTGACCTCTCCCTAATCGGAG
ATTTCCCTTCGGGGACAGTGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCTTTAGTTGCCAGCATT
AAGTTGGGCACTCTAGAGGGACTGCCGAGGATAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCCTTATGCTTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGGTAC
AGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGA
TTGTAGGCTGAAACTCGCCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCGCAGATCAGAA
TGCTGCGGTGAATGCGTTCCCGGGTCTTGTACACCCCGCCCGT

21. >PG59

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTG
GGTGTAAAGGGGGCGCAGACGGTGATGCAAGTCTGAGGTGAAATCCCACGGCTCAA
CTGTGGAATTGCCTTGGAAACTGTAACACTTGAGTGCTGGAGAGGTAAGCGGAATTC
CTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAAGAACATCAGTGGCGAAGGCGGC
TTACTGGACAGCAACTGACGTTGAGGCCCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGAAGGCAAAGCCT
TTCGGTGCCGGCGCTAACGCATTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAAT
AAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC
GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCGATCTGAATGTGATGCAAAAG
TCGCAGCCCTTCGGGGCAGAGAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTTAGCTCGTGTC

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTAAGTAGCCAGCG
GTTCGGCCGGGCACTCTTGGGAGACCGCCGGGGATAACCCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTA
AACAAAGAGAAGCGAGGGAGCGATCCGGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTCAGTT
CGGACTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCACGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
AGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGT

22. >PG65

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTAATAAGTCTGAAGTTAAAGGCAGTGGCTTAAC
CATTGTTCGCTTTGGAAACTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCCA
TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCT
CTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGCCCTTTCCGGGGCTT
AGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGATGCTATTCCTAGAGATAGGA
AGTTTCTTCGGAACATCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA
GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAG
TTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAAC
GAGTCGCGAGTCGGTGACGGCAAGCAAATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTCGGATTG
TAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGC
CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT

23. >PG68

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCTAGCGTTATCCGGATTTATTG
GGTTTAAAGGGAGCGTAGGCGGGCGCTTAAGTCAGCTGTGAAAGTTTGGGGCTCAAC
CTTAAAATTGCAGTTGATACTGGGTGCCTTGAGTGCGGTATAGGCAGGCGGAATTCG

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

TGGTGTAGCGATGAAATGCTTAGATATCACGAAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCTT
GCTGGAGCGTAACTGACGCTGATGCTCGAAAGTGTGGGTATCAAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACACAGTAAACGATGAATACTCGCTGTTTGCGATATATTGTAAGC
GGCCAAGCGAAAGCGTTAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAAAC
TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAATTCGATG
ATACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAATTGCAACCGAATTATCCGGAAACGGGTA
AGCCGCAAGGCGGTTGTGAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGT
GTCGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCCTTATCCACAGTTGCCATCAGGTGATG
CTGGGGACTCTGTGGAGACTGCCGTCGTAAGATGCGAGGAAGGGGGGGATGACGTC
AAATCAGCACGGCCCTTACGTCCGGGGCTACACACGTGTTACAATGGGGGGTACAGC
GGGCAGCTGGGCGGCGACGTCCGGCCAATCCCTAAATCCCCTCTCAGTTCGGACTGG
AGTCTGCAACCCGACTCCACGAAGCTGGATTCGCTAGTAATCGCGCATCAGCCACGG
CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGCACACACCGCCCGT

24. >PG70

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTACTG
GGTGTAAAGGGAGCGTAGGCGGTTTTACAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAAC
TCCGGTATTGCATTGGAAACTGTAGAACTAGAGTGTCGGAGGGGTAAGTGGAATTCC
TAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCT
TACTGGACGATTACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGCGTTGGCTTCCATAGGGAG
TCGGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCCACTGACAAAGTATGTAATGT
ACTCTTCCTTCGGGACAGTGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTTAGTAGCCAGCATT
TCGGATGGGCACTCTAGAGAGACTGCCCGGGTGAACCGGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAA
CAAAGGGAAGCAATCATGTGAGTGTGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTCAGTTCGG

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGA
ATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGT

25. >PG71

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTAATAAGTCTGAAGTTAAAGGCAGTGGCTTAAC
CATTGTTCGCTTTGGAAACTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCCA
TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCT
CTGGTCTGTAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGCCCTTTCCGGGGCTT
AGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGATGCTATTCCTAGAGATAGGA
AGTTTCTTCGGAACATCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGA
GATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAG
TTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACAAC
GAGTCGCGAGTCGGTGGCGGCAAGCAAATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTCGGATTG
TAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGC
CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT

26. >PG73

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGAGGGGTGCAAGCGTTGTTCGGAATTACTG
GGCGTAAAGGGAGCGTAGGCGGAGATTCAAGCGGATTGTACAATCCCGGGGCCCAA
CCCCGGCTCTGCAGTCCGAACTGGATCTCTTGGATAGTTCAGGGGCAGGCGGAATTC
CTGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACACCGATGGCGAAGGCAGC
CTGCTGGGGACTCATCGACGCTGAGGCTCGAAAGTGCGGGTAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCGCACCGTAAACAATGCATACTGGGTGTCCGGGGGTTCCCCCG
GGTACCGTAGCCAACGCGTTAAGTATGCCGCCTGGGGAGTACGTACGCAAGTATGAA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGCAGAACCTTACCAGGGTTTGACATGGGAACGCCGCGGCGAGAGATCGC
CGTTTTGCAGCAATGCAACGTTCCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTTTCCAGTTGCCACC
CGCAAGGGGGCCCTCTGGAGAGACTGCCGGGGACAACCCGGAGGAAGGTGTGGATG
ACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACATCCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGT
ACAATGGGTCGCAACGCCGCGAGGCGGAGCCAATCCTCAAAGCCGTCCTCAGTTCGG
ATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTGGGTCAGC
ACACCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT

27. >PG75

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTG
GGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTAATAAGTCTGAAGTTAAAGGCAGTGGCCTAA
CCATTGTTCGCTTTGGAAACTGTTAGACTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCC
ATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCT
CTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGCCCTTTCCGGGGC
TTAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCCGATGCTATTCCTAGAGATAG
GAAGTTTCTTCGGAACATCGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCCATCATTA
AGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTAATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACG
TCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTGGTACA
ACGAGTCGCGAGTCGGTGACGGCAAGCAAATCTCTTAAAGCCAATCTCAGTTCGGAT
TGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCAC
GCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

28. >PG76

GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTACTG
GGTGTAAAGGGAGCGTAGGCGGTTTTACAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAAC
TCCGGTATTGCATTGGAAACTGTAGAACTAGAGTGTCGGAGGGGTAAGTGGAATTCC
TAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCT
TACTGGACGATTACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGCTTCCATAGGGAG
TCGGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTCTTGACAAAGTATGTAATGT
ACTCTTCCTTCGGGACAAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTAGCTAGCAGT
TCGGCTGAGCACTCTAGGGAGACTGCCCGGGTGAACCGGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAA
CAAAGGGAAGCAAGTAGGTGACTATGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTCAGTTCG
GATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAG
AATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGT

29. >PG78

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTATCCGGATTTACTG
GGTGTAAAGGGAGCGTAGGCGGTTTTACAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAAC
TCCGGTATTGCATTGGAAACTGTAGAACTAGAGTGTCGGAGGGGTAAGTGGAATTCC
TAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCT
TACTGGACGATTACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGCTTCCATAGGGAG
TCGGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGTATTCCACCTGGGGAGTACGTTCGCAAGAATG
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
AAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTCTTGACAAAGTATGTAATGT
ACTCTTCCTTCGGGACAAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTTAGTAGCCAGCATTT
CGGATGGGCACTCTAGAGAGACTGCCCGGGTGAACCGGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTAAAC
AAAGGGAAGCAAGTAGGTGACTATGAGCAAATCTCAAAAATAACGTCTCAGTTCGG
ATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGA
ATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGT

30. >PG85

GTGCCAGCCGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCTAGCGTTATCCGGAATTACTG
GGCGTAAAGGGTGCGTAGGTGGTTTTTTAAGTCAGAAGTGAAAGGCTACGGCTCAAC
CGTAGTAAGCTTTTGAAACTAGAGAACTTGAGTGCAGGAGAGGAGAGTAGAATTCCT
AGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAATACCAGTAGCGAAGGCGGCTC
TCTGGACTGTAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAGGTGTCGGGGGTTACCCCCCTC
GGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTACTCCGCCTGGGAAGTACGCTCGCAAGAGTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGTAGCGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCTAAGCTTGACATCCCACTGACCTCTCCCTAATCGGAG
ATTTCCCTTCGGGGACAGTGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCCTTTAGTTGCCAGCATT
AAGTTGGGCACTCTAGAGGGACTGCCGAGGATAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCCTTATGCTTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGTGGTAC
AGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGA
TTGTAGGCTGAAACTCGCCTACATGAAGCTGGAGTTACTAGTAATCGCAGATCAGAA
TGCTGCGGTGAATGCGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายภูมพงศ์ บุญแสน
วัน เดือน ปี ที่เกิด	24 กันยายน 2527
สถานที่เกิด	อำเภอรัษฎา จังหวัดตรัง
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ได้รับทุนผู้ช่วยสอนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2552) และได้รับทุนพัฒนาบุคลากรระดับปริญญาโทจาก สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (สวทช.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์