

ผลการใช้จุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* เป็นโพรไบโอติกต่อลักษณะทางชีวเคมีในกระเพาะรูเมน การย่อยสลายในกระเพาะรูเมนของวัตถุดิบอาหารสัตว์และสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนะในโคเนื้อ

จิระศักดิ์ ชอบแต่ง^{1/} อรวิมล แก้วเกลี้ยง^{2/} วรณา อ่างทอง^{2/} ราไพร นามสีลี^{2/} ปฏิมา บุตรชา^{2/}

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้จุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ที่มีผลต่อลักษณะทางชีวเคมีในกระเพาะรูเมน การย่อยสลายในกระเพาะรูเมนของวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดต่าง ๆ รวมถึงสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนะต่าง ๆ วางแผนการทดลองแบบสลับ (switch-back design) ที่มี 2 บล็อก 3 ช่วงการทดลอง และ 2 สิ่งทดลอง คือ (1) การใช้ *B. subtilis* เสริมให้โคกินในอัตรา 2% ของอาหาร (ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ *B. subtilis* เท่ากับ 1×10^6 CFU (colony-forming unit)/มิลลิลิตร) และ (2) การไม่ใช้ *B. subtilis* (กลุ่มควบคุม) โดยใช้โคลูกผสมบราห์มันเพศผู้ที่เจาะกระเพาะและใส่ท่อแบบถาวรจำนวน 4 ตัว ผลการทดลองพบว่า โคกลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจน ความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยง่ายและจำนวนจุลินทรีย์จากของเหลวในกระเพาะรูเมนไม่แตกต่าง ($p>0.05$) กับโคในกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ การย่อยสลายในกระเพาะรูเมนของวัตถุดิบอาหารสัตว์ทั้ง 13 ชนิด และสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนะต่าง ๆ ความเข้มข้นของอนุพันธ์พิวรีน (purine derivatives) ในปัสสาวะ และการสะสมไนโตรเจนในร่างกายของโคทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) อย่างไรก็ตาม การใช้จุลินทรีย์ทำให้การย่อยสลายในกระเพาะรูเมนของกากถั่วเหลือง ($p=0.0771$) รำละเอียด ($p=0.0982$) หย้าแวงโกลาแห้งคุณภาพต่ำ ($p=0.0581$) และถั่วพาสเตอไรซ์ ($p=0.0985$) รวมถึงความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยง่ายทั้งหมด ($p=0.0582$) มีแนวโน้มสูงขึ้น สรุปได้ว่า คุณประโยชน์ทางด้านการเพิ่มประสิทธิภาพด้านอาหารสัตว์จากการเสริมใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติก *B. subtilis* ที่มีความเข้มข้น 1×10^6 CFU/มิลลิลิตร ให้กับโคในอัตรา 2% ของปริมาณอาหารที่กินและให้โคกินอาหารในระดับเพื่อการดำรงชีพ (โคได้รับจุลินทรีย์จำนวน 4.02×10^8 CFU/ตัว/วัน) ยังไม่ชัดเจน

คำสำคัญ: *Bacillus subtilis* โพรไบโอติก การย่อยสลายในกระเพาะรูเมน สัมประสิทธิ์การย่อยได้

เลขทะเบียนวิชาการ: 65(2)-0214-011

^{1/} สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ ต.บางกะดี อ.เมืองปทุมธานี จ.ปทุมธานี 12000

^{2/} ศูนย์วิจัยและพัฒนามาตรฐานอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ต.ท่าพระ อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40260

Effects of *Bacillus subtilis* as a probiotic source on ruminal biochemical traits, ruminal degradability of feed ingredients and digestibility of nutrients in beef cattle

Jeerasak Chobtang^{1/} Ornvimol Kaeokliang^{2/} Wanna Angthong^{2/} Ramphrai Narmseelee^{2/}
Patima Butcha^{2/}

Abstract

An objective of the present study was to evaluate the beneficial effects of using *Bacillus subtilis* as a probiotic source on biochemical traits in rumen, ruminal degradability of feedstuffs and total-tract nutrient digestibility. A switchback design with 2 blocks and 3 periods was used. Two treatments comprised (1) cattle received *B. subtilis* at a rate of 2% of feed intake (1×10^6 CFU (colony-forming unit)/ml) and (2) cattle did not receive *B. subtilis* (control). Four male rumen-fistulated Brahman cattle were used. Results showed that the biochemical properties (pH, ammonia-nitrogen and volatile fatty acids) and microorganism counts in the ruminal liquid did not differ between the two treatments ($p > 0.05$). In addition, there were no significant differences in ruminal organic matter degradability of any feedstuffs and total-tract nutrient digestibility ($p > 0.05$). As well, urinary purine derivatives and nitrogen fates between the two treatments did not differ ($p > 0.05$). However, there was a tendency increase in ruminal degradability of soybean meal ($p = 0.0771$), rice bran ($p = 0.0982$), low quality pangola grass hay ($p = 0.0581$) and ground *Thapra stylo* ($p = 0.0985$), and total volatile fatty acids ($p = 0.0582$) in cattle received *B. subtilis*. In conclusion, the beneficial effect of *B. subtilis* as a probiotic source (4.02×10^8 CFU/d) on feed efficiency is not pronounced.

Keywords: *Bacillus subtilis*, probiotic, ruminal degradability, digestibility

Registered No: 65(2)-0214-011

^{1/}Bureau of Animal Nutrition Development, Department of Livestock Development, Bangkokadee, Muang PathumThani, PathumThani, 12000.

^{2/}Ruminants Feeding Standard and Development Center, Thapra, Muang, Khon Kaen, 40260.

บทนำ

การใช้สารเสริมอาหารสัตว์ประเภทจุลินทรีย์มีชีวิตที่ไม่ก่อโรคแต่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร สัตว์และสุขภาพของสัตว์ หรือ จุลินทรีย์โพรไบโอติก ได้รับความนิยมมากขึ้น โดยเฉพาะในสัตว์กระเพาะเดี่ยว เช่น สุกรและสัตว์ปีก โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของสัตว์ผ่านทางกลไกที่สำคัญ ได้แก่ การเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่ดีซึ่งจะช่วยควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ (Fuller, 1989) ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยอาหารและการดูดซึมสารอาหาร (Vieira et al., 2014) และช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน (Reid, 2008) ซึ่งจะช่วยลดอัตราการติดเชื้อ (ไวรุจัน และคณะ, 2550) สำหรับระบบการผลิต สัตว์เคี้ยวเอื้อง สัตว์ปีก และ เมธา (2558) รายงานว่า การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกช่วยให้การย่อยได้ของอาหาร ดีขึ้น ในระบบการเลี้ยงโคนม การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกช่วยให้โคมีผลผลิตน้ำนมเพิ่มขึ้น (Vieira et al., 2014; Sun et al., 2013; Peng et al., 2012) และช่วยลดจำนวนเซลล์โซมาติกในน้ำนม (Xu et al., 2017) อย่างไรก็ตาม กลไกการทำงานที่ส่งผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสัตว์จะแตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์ จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่แตกต่างกัน (Fajardo et al., 2012)

Bacillus subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่นิยมนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกเนื่องจากเจริญเติบโตเร็ว สามารถเพาะเลี้ยงได้ ทำให้ง่ายต่อการผลิตเชิงการค้า และมีการสร้างสปอร์ที่ทนทานกว่าเซลล์สภาวะปกติ (Vegetative cell) (ไวรุจัน และคณะ, 2550) ไม่ก่อโรคต่อสัตว์ (Souza et al., 2017) ถึงแม้ว่ายังไม่ทราบ กลไกการทำงานอย่างแน่ชัด แต่มีรายงานว่า การใช้ *B. Subtilis* ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยและการดูดซึม สารอาหาร เพิ่มความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารและเพิ่มผลผลิตและคุณภาพน้ำนม (Sun et al., 2013) Manhar et al. (2016) รายงานว่า จากการทดลองในห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ *B. subtilis* AMS6 สามารถเพิ่มการย่อยสลายเซลลูโลสได้ อย่างไรก็ตาม ข้อมูลการใช้จุลินทรีย์ *B. Subtilis* ในประเทศไทยยังมี น้อยมาก ดังนั้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้จุลินทรีย์ *B. subtilis* ที่มีต่อระบบ นิเวศน์วิทยาในกระเพาะรูเมน การย่อยสลายในกระเพาะรูเมนของวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดต่าง ๆ และสัมประสิทธิภาพการย่อยได้ของโภชนะต่าง ๆ รวมถึงการประเมินปริมาณจุลินทรีย์โปรตีนที่ไหลออกจาก กระเพาะหมัก

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สถานที่ดำเนินการทดลอง

ดำเนินการทดลองที่ศูนย์วิจัยและพัฒนามาตรฐานอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ต. ท่าพระ อ. เมือง จ. ขอนแก่น ระหว่างเดือนมกราคม 2562– มีนาคม 2563

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสลับ (switch-back design) มี 2 สิ่งทดลอง คือ (1) การใช้จุลินทรีย์ *B. subtilis* เป็นโพรไบโอติกผสมอาหารในอัตรา 2% ของปริมาณอาหารที่กิน (น้ำหนักสด) ซึ่งเป็นอัตราตาม คำแนะนำของผลิตภัณฑ์ และ (2) การไม่ใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติก (กลุ่มควบคุม) ใช้โคทดลอง จำนวน 4 ตัว และมี 3 ช่วงการทดลอง (period) โดยในแต่ละช่วงของการทดลองจะห่างกัน 18 วัน ทั้งนี้เพื่อลดผลตกค้างที่ อาจจะเกิดจากอิทธิพลของการใช้จุลินทรีย์ในช่วงการทดลองก่อนหน้า ช่วงการทดลองมี 21 วัน โดยในช่วง 14 วันแรกเป็นระยะปรับตัวของสัตว์และช่วง 7 วัน เป็นช่วงเก็บข้อมูล

สัตว์ทดลองและการจัดการ

ใช้โคเนื้อลูกผสมบรรพพันธุ์พื้นเมืองที่มีการเจาะกระเพาะหมักและใส่ท่อแบบถาวรจำนวน 4 ตัว โคมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 637 ± 56 กิโลกรัม แบ่งโคทดลองออกเป็น 2 บล็อก ตามน้ำหนักตัวของโค จำนวนบล็อกละ 2 ตัว ก่อนการทดลอง 2 สัปดาห์ ทำการถ่ายพยาธิภายในและภายนอกและฉีดวิตามิน AD_3E เลี้ยงโคในคอกเดี่ยวขนาด 1.5×5.0 ตารางเมตร โดยมีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา

เลี้ยงโคด้วยอาหารข้นสำเร็จรูปที่มีโปรตีน 17.14% และใช้ข้าวโพดพร้อมฝักหมักที่มีโปรตีน 6.71% เป็นอาหารหยาบในสัดส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบเท่ากับ 40:60 (โดยน้ำหนักแห้ง) โคได้รับอาหาร (น้ำหนักแห้ง) ในอัตรา 1.1% ของน้ำหนักตัว ซึ่งเป็นระดับที่โคจะได้รับโปรตีนสูงกว่าระดับเพื่อการดำรงชีพเล็กน้อย (คณะกรรมการจัดทำมาตรฐานอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องของประเทศไทย, 2551) โดยแบ่งการให้อาหารสัตว์เป็น 2 มื้อๆ ละเท่าๆ กัน ในเวลา 09.00 น. และ 15.00 น.

สำหรับโคทดลองกลุ่มที่ได้รับ *B. Subtilis* จะทำการคลุกเคล้าจุลินทรีย์กับอาหารสัตว์แล้วนำไปให้โคกินทันที โดยจุลินทรีย์ *B. Subtilis* อยู่ในรูปของเหลวมีจำนวนจุลินทรีย์เท่ากับ 1×10^6 CFU (colony-forming unit)/มิลลิลิตร และเนื่องจากการทดลองนี้จำกัดปริมาณการให้อาหารกับโค ดังนั้น โคในกลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์โปรไบโอติกจะได้รับจุลินทรีย์ *B. subtilis* ในอัตราเฉลี่ย 4.02×10^8 CFU/ตัว/วัน

การศึกษาการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนของวัตถุดิบอาหารสัตว์

ศึกษาการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนโดยใช้เทคนิคถุงไนลอน (Nylon bag technique) ตามวิธีของ Ørskov and McDonald (1979) ใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์จำนวน 13 ชนิด ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เป็นแหล่งโปรตีนมี 3 รายการ ได้แก่ (1) กากถั่วเหลือง (2) รำละเอียด และ (3) กากปาล์มน้ำมัน

กลุ่มที่ 2 วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เป็นแหล่งพลังงานมี 3 รายการ ได้แก่ (1) ข้าวโพดบด (2) มันเส้นบด และ (3) กากมันสำปะหลังสด

กลุ่มที่ 3 วัตถุดิบที่เป็นแหล่งอาหารหยาบมี 7 รายการ ได้แก่ (1) หญ้าแพงโกลาแห้งคุณภาพปานกลาง (อายุการตัดมากกว่า 45 วัน แต่ไม่เกิน 60 วัน) (2) หญ้าแพงโกลาแห้งคุณภาพต่ำ (อายุการตัดมากกว่า 60 วัน) ซึ่งจัดเตรียมตามคำแนะนำวิธีการทำหญ้าแห้ง (กรมปศุสัตว์, 2544ก) (3) หญ้าเนเปียร์หมักอายุการตัด 60 วันจัดเตรียมตามคำแนะนำวิธีการทำหญ้าหมัก (กรมปศุสัตว์, 2544ข) (4) ข้าวโพดพร้อมฝักหมักอายุการตัดที่ระยะน้ำนม 50% (จัดซื้อจากร้านขายวัตถุดิบอาหารสัตว์ในจังหวัดขอนแก่น) (5) ฟางข้าว (จัดซื้อจากร้านที่จำหน่ายในจังหวัดขอนแก่น) (6) ใบกล้วยทำพระสไตโลปที่มีอายุการตัด 45-60 วัน จัดเตรียมตามคำแนะนำของกรมปศุสัตว์ (2553ก, ข) และ (7) กระถินปน ซึ่งเป็นใบกระถินรวมกัน

สุ่มตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์ชนิดละ 500 กรัม จากนั้นแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำมาบดผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 2 มิลลิเมตร สำหรับใช้ในการศึกษาการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนโดยเทคนิคหย่อนถุงไนลอน และส่วนที่ 2 บดผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 1 มิลลิเมตร สำหรับใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมี

สำหรับการศึกษาการย่อยสลาย นำตัวอย่างวัตถุดิบอาหารสัตว์ประมาณ 5 กรัมใส่ในถุงไนลอน (มีรูขนาด 35-45 ไมโครเมตร) ขนาด 8×13 เซนติเมตร มัดปากถุงให้แน่นแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C นาน 48 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำไปหย่อนลงในกระเพาะหมักของโคเจาะกระเพาะ จำนวน 4 ตัว ตามแผนการทดลอง โดยเริ่มหย่อนถุงไนลอนในช่วง 2 วันสุดท้ายของการทดลองในแต่ละช่วง เมื่อครบ 48 ชั่วโมง นำถุงไนลอนออกจากกระเพาะรูเมนแล้วล้างด้วยน้ำสะอาดเพื่อให้เศษอาหารจากกระเพาะรูเมนที่ติดมากับถุงออกให้หมด จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C นาน 48 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนัก นำกากที่เหลือไปวิเคราะห์หาค่าวัตถุแห้งและเถ้าตามวิธีของ AOAC (2016)

การศึกษาสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนะ

ประเมินสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนะต่าง ๆ ของอาหารสัตว์โดยใช้ผนังเซลล์ที่ไม่ย่อยสลายในกระเพาะรูเมน (undegradable neutral detergent fiber, uNDF) เป็นตัวบ่งชี้ (Velásquez et al., 2018) สุ่มเก็บตัวอย่างมูลโดยวิธี grab sampling วันละ 2 ครั้ง ๆ ละ 200 กรัม ในช่วงเวลา 10.00-12.00 น. และ 15.00-17.00 น. เก็บมูลต่อเนื่องเป็นเวลา 5 วันในช่วงสุดท้ายของการทดลองแต่ละช่วง นำมูลที่เก็บได้ไปแช่แข็งอุณหภูมิ -20°C เพื่อหยุดกิจกรรมของจุลินทรีย์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองในแต่ละช่วงการทดลองนำมูลโคแต่ละตัวมาคลุกเคล้ารวมกัน จากนั้นแบ่งส่วนหนึ่งไปอบที่อุณหภูมิ 105°C นาน 18 ชั่วโมง เพื่อหาวัตถุแห้ง และส่วนที่เหลือนำมาอบที่อุณหภูมิ 65°C นาน 72 ชั่วโมง แล้วนำมาบดผ่านตะแกรงที่มีรูขนาด 1 มิลลิเมตร แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งสำหรับใช้วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีอีกส่วนหนึ่งสำหรับใช้หาค่าผนังเซลล์ที่ไม่ย่อยสลายในกระเพาะรูเมนตามวิธีของ Velásquez et al. (2018) โดยการนำตัวอย่างอาหารสัตว์และตัวอย่างมูลสัตว์ใส่ถุงไนลอน (Ørskov and McDonald, 1979) แล้วนำไปหย่อนในกระเพาะโคเจาะกระเพาะเป็นเวลา 15 วัน จากนั้นนำตัวอย่างที่เหลือในถุงไนลอนมาหาค่าผนังเซลล์ (neutral detergent fiber, NDF) ตามวิธีของ AOAC (2016)

การศึกษาค่าชีวเคมีและจำนวนจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน

เก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนในวันสุดท้ายของการทดลองของแต่ละช่วงการทดลองในช่วงก่อนให้อาหาร (0 ชั่วโมง) และหลังการให้อาหาร 4 ชั่วโมง โดยวิธีเก็บโดยตรงจากกระเพาะรูเมนผ่านทางท่อแบบถาวร สุ่มเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมน 100 มิลลิลิตร กรองโดยใช้ผ้าขาวบาง 2 ชั้น จากนั้นนำไปวัดและวิเคราะห์ค่าทางชีวเคมีดังนี้

(1) วัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมน 20 มิลลิลิตร วัด pH ทันทีด้วยเครื่องวัด pH

(2) วิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายและแอมโมเนียไนโตรเจน โดยใช้ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนจำนวน 30 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 1 มิลลิลิตรต่อปริมาณตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมน 9 มิลลิลิตร เพื่อหยุดการทำงานของจุลินทรีย์ แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บเอาเฉพาะส่วนใส (supernatant) จำนวน 15 มิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ในตู้แช่ -20°C เพื่อรอวิเคราะห์หากรดไขมันระเหยง่ายด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Shimadzu GC2010, Japan) และวิเคราะห์แอมโมเนียไนโตรเจนตามวิธีการของ Bremner and Keeney (1965)

(3) ประเมินจำนวนจุลินทรีย์โดยใช้ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนจำนวน 50 มิลลิลิตร โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกใช้ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมน 1 มิลลิลิตรเติมฟอร์มาลีน (formalin) 10% ในน้ำเกลือ 0.9% (ในอัตราส่วนของเหลวจากกระเพาะรูเมน 1 ส่วนต่อฟอร์มาลีน 10% ในน้ำเกลือ 0.9% 9 ส่วน) ลงไปทันที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธีนับโดยตรง (Direct count) ตามวิธีของ Galyean (1989) ส่วนที่ 2 ประเมินปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacterial count) และวัดปริมาณแบคทีเรียที่ย่อยเยื่อใย (Fibrolitic bacteria) โดยเทคนิค roll tube ตามวิธีของ Ogimoto and Imai (1981)

การศึกษปริมาณ purine derivatives ในปัสสาวะ

สุ่มเก็บตัวอย่างปัสสาวะ (spot sampling) โคทดลอง วันละ 3 ครั้ง ในช่วงเวลา 12.00-14.00 น. 15.00-17.00 น. และ 18.00-20.00 น. ติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน ในช่วงสุดท้ายของการทดลองแต่ละช่วง เติม

กรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 20% (v/v) ในอัตราส่วนปัสสาวะต่อกรด เท่ากับ 100 ต่อ 1 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการสูญเสียไนโตรเจนจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ สุ่มตัวอย่างปัสสาวะจำนวน 20% ของปัสสาวะที่เก็บได้ในแต่ละวัน แล้วนำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4° C เพื่อวิเคราะห์หาค่า allantoin ด้วยวิธี colorimetric method (Young and Conway, 1942) วิเคราะห์ค่าการคั่งของยูเรียโดยใช้วิธีของ Fujuhara et al. (1987) และวิเคราะห์ค่า creatinine วิเคราะห์โดยใช้ colorimetry (Balcells et al., 1992)

การวิเคราะห์ทางเคมี

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบอาหารสัตว์และตัวอย่างมูลโค ได้แก่ วัตถุแห้ง (dry matter) โปรตีนหยาบ (crude protein) ไขมัน (ether extract) เถ้า (ash) ผนังเซลล์ (Neutral detergent fiber) ลิกโนเซลลูโลส (Acid detergent fiber) ลิกนิน (Acid detergent lignin) และวิเคราะห์ค่าไนโตรเจนในตัวอย่างปัสสาวะโดยวิธีของ AOAC (2016)

การคำนวณและการวิเคราะห์ทางสถิติ

คำนวณค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ โดยใช้วิธีการและสมการดังนี้

- (1) คำนวณหาการย่อยสลายของอินทรีย์วัตถุโดยใช้สมการดังนี้

การย่อยสลายของอินทรีย์วัตถุ (%) = $100 - [(ปริมาณอินทรีย์วัตถุที่เหลือในถุงหลังบ่ม 48 ชั่วโมง / ปริมาณอินทรีย์วัตถุก่อนบ่ม) \times 100]$

- (2) ประเมินสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนะต่าง ๆ โดยใช้สมการดังนี้

สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของวัตถุแห้ง (%) = $100 - [(\%uNDF \text{ ในอาหาร} / \%uNDF \text{ ในมูล}) \times 100]$

สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนะต่าง ๆ (%) = $100 - [(\%uNDF \text{ ในอาหาร} \times \%โภชนะ \text{ ในมูล}) / \%uNDF \text{ ในมูล} \times \%โภชนะ \text{ ในอาหาร}] \times 100]$

โดยที่ uNDF หมายถึง ผนังเซลล์ที่ไม่ย่อยสลายในกระเพาะรูเมน (%uNDF = ปริมาณ NDF ที่ไม่ย่อยสลายในกระเพาะรูเมนหลังจากบ่มนาน 15 วัน / ปริมาณ NDF ก่อนบ่ม $\times 100$)

- (3) ประเมินปริมาณการขับถ่ายปัสสาวะของโคโดยใช้ creatinine เป็นตัวบ่งชี้ตามวิธีของ Valadares et al. (1999) ดังนี้

ปริมาณปัสสาวะ (ลิตร/วัน) = ปริมาณ creatinine excretion (มิลลิกรัม/วัน) / ความเข้มข้นของ creatinine ในปัสสาวะ (มิลลิกรัม/ลิตร)

โดยที่ปริมาณการขับถ่าย creatinine (มิลลิกรัม/วัน) ในปัสสาวะ = $32.27 - (0.01093 \times \text{น้ำหนักตัวของโค (กก.)})$ (Lazzarini et al., 2009)

- (4) ประเมินปริมาณการดูดซึม purines จากจุลินทรีย์ (purine absorbed, PA) โดยใช้ปริมาณ purine derivatives (PD) ในปัสสาวะโดยใช้สมการของ Barbosa et al. (2011) ดังนี้

ปริมาณ PD ในปัสสาวะ (มิลลิโมล/วัน) = $0.8 \times PA + (0.30 \times BW^{0.75})$

โดยที่ PA หมายถึง ปริมาณการดูดซึม purines จากจุลินทรีย์ และ $BW^{0.75}$ หมายถึง น้ำหนักเมแทบอลิกของโค

- (5) ประเมินปริมาณจุลินทรีย์โปรตีน (Microbial N) จากปริมาณการดูดซึม purines จากจุลินทรีย์โดยใช้สมการของ Barbosa et al. (2011) ดังนี้

Microbial N (กรัม/ไนโตรเจน/วัน) = $[(PA \times 70) / (0.137 \times 0.93 \times 1000)]$

- (6) ประเมินประสิทธิภาพการดูดซึมไนโตรเจนโดยใช้สมการดังนี้

ไนโตรเจนที่ดูดซึม (กรัม/วัน) = ไนโตรเจนที่กินได้ (กรัม/วัน) - ไนโตรเจนในมูล (กรัม/วัน)

(7) ประเมินประสิทธิภาพการเก็บกักไนโตรเจนโดยใช้สมการดังนี้
 ไนโตรเจนที่เก็บกัก (กรัม/วัน) = ไนโตรเจนที่กินได้ (กรัม/วัน) – [ไนโตรเจนในมูล (กรัม/วัน)
 + ไนโตรเจนในปัสสาวะ (กรัม/วัน)]

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) โดยมีแบบหุ้ทางสถิติ(statistical model) ของแผนการทดลองแบบสลับ (Sanders and Gaynor, 1987) ดังนี้

$$Y_{ijk} = \mu + \text{Block}_i + \text{Cattle}_{j(i)} + b_{ij}\text{Period}_{k(l)} + \text{Period}_{k(l)} + \text{Treatment}_l + \epsilon_{ijkl}$$

เมื่อ Y_{ijk} คือ ค่าสังเกตที่เกิดจากโค (Cattle) ตัวที่ j ในบล็อก (Block) ที่ i ในช่วงการทดลอง (period) ที่ k ได้รับสิ่งทดลอง (Treatment) ที่ l และ b_{ij} หมายถึง ค่าสัมประสิทธิ์สมการถดถอย (partial regression coefficient) สำหรับโคตัวที่ j ในบล็อกที่ i ของช่วงการทดลอง k และสิ่งทดลอง l และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยระหว่างสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองนี้เป็นการทดสอบสมมุติฐานว่าการใช้จุลินทรีย์ *B. subtilis* เป็นโปรไบโอติกมีผลทำให้สัดส่วนของประชากรจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของโคเนื้อมีการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่จะส่งผลให้เกิดการเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารของโคเนื้อและส่งผลให้มีจุลินทรีย์โปรตีนรวมถึงการสะสมไนโตรเจนในร่างกายสัตว์เพิ่มขึ้น

องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบอาหารสัตว์

ตารางที่ 1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของอาหารสัตว์และวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีค่าองค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ อยู่ในช่วงปกติ ใกล้เคียงกับรายงานของ วรณและคณะ (2547) และวลัยกานต์และคณะ (2559)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้ศึกษาหาการย่อยได้

	DM (%)	CP	Ash	EE	NDF	ADF	ADL
	----- % of DM-----						
อาหารสำหรับโคทดลอง							
อาหารข้น	89.04	17.14	9.79	6.89	30.14	23.22	1.93
ข้าวโพดพร้อมฝักหมัก	27.03	6.71	4.93	1.75	61.06	31.22	4.02
วัตถุดิบอาหารสัตว์สำหรับศึกษาการย่อยสลายในกระเพาะรูเมน							
กากถั่วเหลือง	89.36	46.24	7.40	0.66	16.57	11.96	0.50
รำละเอียด	89.57	17.79	7.13	13.20	9.19	5.00	1.23
กากปาล์มน้ำมัน	93.83	16.63	4.59	10.77	71.11	48.90	14.16
ข้าวโพดบด	87.13	9.30	1.74	5.41	14.76	4.90	0.48
มันเส้น	88.25	2.44	2.41	0.23	13.30	5.08	1.24
กากมันสำปะหลังสด	21.72	1.98	1.77	0.18	54.84	16.67	2.68
หญ้าแพงโกลาแห้ง (คุณภาพต่ำ)	83.09	4.13	6.44	1.42	74.75	49.41	8.20
หญ้าแพงโกลาแห้ง (คุณภาพปานกลาง)	92.31	5.11	7.07	1.55	71.51	44.22	5.42
ข้าวโพดพร้อมฝักหมัก	24.43	8.17	6.66	1.77	55.88	36.35	5.57

หญ้าเนเปียร์หมัก	15.84	8.64	7.83	2.14	50.57	48.06	6.27
ถั่วท่าพระสโตไลบด	93.56	11.21	6.21	0.62	63.61	57.22	12.34
ฟางข้าว	94.86	3.39	13.66	0.83	71.73	48.26	5.36
กระถินปน	92.46	14.57	7.17	7.23	44.75	54.50	10.89

DM = วัตถุแห้ง (dry matter); CP = โปรตีนหยาบ (crude protein); EE = ไขมัน (ether extract); Ash = เถ้า; NDF = ผนังเซลล์ (neutral detergent fiber); ADF = ลิกโนเซลลูโลส (acid detergent fiber) และ ADL = ลิกนิน (lignin)

การย่อยสลายในกระเพาะรูเมนของอินทรีย์วัตถุอาหารสัตว์

การย่อยสลายในกระเพาะรูเมนของอินทรีย์วัตถุของวัตถุดิบอาหารสัตว์ทั้ง 13 ชนิด ในโคทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตาม การย่อยสลายในกระเพาะรูเมนของอินทรีย์วัตถุของกากถั่วเหลือง ($p=0.0647$) รำละเอียด ($p=0.0982$) หญ้าแพงโกลาแห้งคุณภาพต่ำ ($p=0.0581$) และถั่วท่าพระสโตไลบด ($p=0.0985$) ในโคที่ได้รับ *B. Subtilis* มีแนวโน้มสูงกว่าในโคในกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 2 การย่อยสลายในกระเพาะรูเมนของอินทรีย์วัตถุของวัตถุดิบอาหารสัตว์

	ใช้จุลินทรีย์	ไม่ใช้จุลินทรีย์	SEM	p-value
วัตถุดิบที่เป็นแหล่งโปรตีน				
กากถั่วเหลือง	99.49	99.42	0.01	0.0647
รำละเอียด	95.03	94.70	0.04	0.0982
กากปาล์มน้ำมัน	81.63	82.22	0.17	0.2471
วัตถุดิบที่เป็นแหล่งพลังงาน				
ข้าวโพดบด	98.03	97.51	0.30	0.4467
มันเส้น	97.73	97.43	0.19	0.4834
กากมันสำปะหลังสด	94.17	93.22	0.46	0.3912
วัตถุดิบที่เป็นแหล่งอาหารหยาบ				
หญ้าแพงโกลาแห้ง (คุณภาพต่ำ)	54.78	50.05	0.30	0.0581
หญ้าแพงโกลาแห้ง (คุณภาพปานกลาง)	74.15	71.09	1.40	0.3722
หญ้าเนเปียร์หมัก	69.22	66.90	1.06	0.3722
ข้าวโพดหมัก	71.26	69.05	1.00	0.3714
ถั่วท่าพระสโตไลบด	60.57	58.43	0.23	0.0985
ฟางข้าว	55.96	51.18	1.19	0.2212
ใบกระถินปน	65.63	65.04	0.10	0.1588

SEM = standard error of the mean

ปริมาณการกินได้และสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนะ

โคทั้งสองกลุ่มมีปริมาณการกินอาหารและโปรตีนใกล้เคียงกันทั้งนี้เนื่องจากการทดลองนี้มีการจำกัดปริมาณอาหารสำหรับใช้เลี้ยงโคให้อยู่ในระดับเพื่อการดำรงชีพ (ตารางที่ 3) โคทั้งสองกลุ่มมีสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนะต่าง ๆ ได้แก่ วัตถุแห้ง (เฉลี่ยเท่ากับ 74.28%) อินทรีย์วัตถุ (เฉลี่ยเท่ากับ 76.62%) โปรตีน

(เฉลี่ยเท่ากับ 73.55%) ไขมัน (เฉลี่ยเท่ากับ 91.45%) ผัสดัด (เฉลี่ยเท่ากับ 66.90%) ลิกโนเซลลูโลส (เฉลี่ยเท่ากับ 56.68%) และพลังงาน (เฉลี่ยเท่ากับ 75.38%) ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) (ตารางที่ 3) ผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับ Souza et al. (2017) ที่ได้ศึกษาผลการใช้จุลินทรีย์ *B. subtilis* C-3102 ในอัตรา 3×10^9 CFU/วัน และพบว่า การใช้จุลินทรีย์ดังกล่าวไม่ช่วยให้การย่อยได้ของวัตถุดิบ อินทรีย์วัตถุและผัสดัดเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการไม่ใช้จุลินทรีย์ ในขณะที่ Sun et al. (2013) รายงานว่า การใช้จุลินทรีย์ *B. Subtilis natto* ในอัตรา 1×10^{11} CFU/ตัว/วัน ในอาหารโคนมไม่ทำให้การย่อยสลายในถุงไนลอน (in sacco) ของวัตถุดิบเพิ่มขึ้นแต่ทำให้การย่อยสลายของผัสดัดลดลงเนื่องจากการใช้จุลินทรีย์มีผลทำให้จำนวนและกิจกรรมของแบคทีเรียที่ย่อยเยื่อใย (fibrolytic bacteria) ลดลง

สำหรับการทดลองนี้การใช้จุลินทรีย์ *B. subtilis* ไม่มีผล ($p>0.05$) ต่อจำนวน cellulolytic bacteria ในกระเพาะรูเมนจึงมีความเป็นไปได้ที่การย่อยได้ของเยื่อใยหรือผัสดัดไม่แตกต่างกับการไม่ใช้จุลินทรีย์ และปริมาณการใช้จุลินทรีย์ *B. subtilis* ในการทดลองนี้ (4.02×10^8 CFU/ตัว/วัน) น้อยกว่าปริมาณการใช้จุลินทรีย์ในการศึกษาข้างต้นถึง 7 และ 250 เท่า ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ปริมาณการกินได้ของโคทดลองและสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนาต่าง ๆ

รายละเอียด	ใช้จุลินทรีย์	ไม่ใช้จุลินทรีย์	SEM	p-value
วัตถุดิบที่กินได้ (กิโลกรัม/วัน)	7.45	7.43	0.0043	-
อาหารข้น	2.89	2.89	0.0010	-
ข้าวโพดหมัก	4.54	4.54	0.0000	-
จุลินทรีย์ <i>B. subtilis</i>	0.02	0	0.0000	-
โปรตีนหยาบที่กินได้ (กิโลกรัม/วัน)	0.81	0.81	0.003	-
อาหารข้น	0.50	0.50	0.001	-
ข้าวโพดหมัก	0.31	0.31	0.00	-
จุลินทรีย์ <i>B. subtilis</i>	0.005	0	0.00	-
สัมประสิทธิ์การย่อยได้ (%)				
วัตถุดิบ	75.17	73.39	0.71	0.3356
อินทรีย์วัตถุ	77.47	75.77	0.63	0.3151
โปรตีนหยาบ	75.52	71.58	1.18	0.2608
ไขมัน	91.77	91.14	0.10	0.1491
ผัสดัด	67.85	65.94	0.59	0.2683
ลิกโนเซลลูโลส	58.48	54.87	0.74	0.1853
พลังงาน	76.15	74.60	0.67	0.3554

SEM = standard error of the mean

ลักษณะทางชีวเคมีในกระเพาะรูเมน

ค่าทางชีวเคมีและจำนวนจุลินทรีย์จากของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคทั้งก่อนและหลังการให้อาหารแสดงในตารางที่ 4 โคทั้งสองกลุ่มมีค่า pH ค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียและกรดไขมันระเหยง่ายชนิดต่าง ๆ ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยค่า pH ทั้งก่อนและหลังให้อาหารของโคทั้งสองกลุ่มอยู่ในช่วงปกติซึ่งมีค่าระหว่าง 6.0-7.0 (Ørskov and Ryle, 1998) ในทำนองเดียวกัน ความเข้มข้นของแอมโมเนียมีค่าอยู่ระหว่าง 6.27-7.41 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงปกติ คือ 5-13 มิลลิกรัม/เดซิลิตร (Boucher et al., 2007) โดยทั่วไป

ความเข้มข้นของแอมโมเนียในกระเพาะรูเมนจะใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของไนโตรเจนในอาหารที่จะถูกใช้และเปลี่ยนเป็นโปรตีนของจุลินทรีย์ (Broderick and Muck 2009) ซึ่งจะแปรผันตามความสามารถในการถูกหมักย่อยโปรตีนของอาหารแต่ละชนิด (Eardman et al., 1986)

ตารางที่ 4 ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณแอมโมเนียและกรดไขมันระเหยง่ายในของเหลวจากกระเพาะรูเมน

รายละเอียด	ใช้จุลินทรีย์	ไม่ใช้จุลินทรีย์	SEM	p-value
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)				
0 ชั่วโมงก่อนให้อาหาร	6.22	6.19	0.02	0.5255
4 ชั่วโมงหลังให้อาหาร	5.91	6.09	0.10	0.4238
แอมโมเนียไนโตรเจน (NH ₃ -N, มิลลิกรัม/เดซิลิตร)				
0 ชั่วโมงก่อนให้อาหาร	6.27	7.41	0.42	0.3136
4 ชั่วโมงหลังให้อาหาร	6.86	6.24	0.30	0.3954
กรดอะซิติก (Acetic acid, มิลลิโมล/ลิตร)				
0 ชั่วโมงก่อนให้อาหาร	46.22	44.30	0.40	0.1886
4 ชั่วโมงหลังให้อาหาร	64.20	61.85	1.70	0.5178
กรดโพรพิโอนิก (Propionic acid, มิลลิโมล/ลิตร)				
0 ชั่วโมงก่อนให้อาหาร	7.51	6.51	0.34	0.2929
4 ชั่วโมงหลังให้อาหาร	13.97	12.20	0.85	0.3888
กรดบิวทีริก (Butyric acid, มิลลิโมล/ลิตร)				
0 ชั่วโมงก่อนให้อาหาร	7.58	6.88	0.29	0.3427
4 ชั่วโมงหลังให้อาหาร	14.32	13.29	1.05	0.6232
กรดวาเลริก (Valeric acid, มิลลิโมล/ลิตร)				
0 ชั่วโมงก่อนให้อาหาร	1.39	1.18	0.09	0.3689
4 ชั่วโมงหลังให้อาหาร	2.63	2.24	0.14	0.3162
กรดไขมันที่ระเหยง่ายทั้งหมด (มิลลิโมล/ลิตร)				
0 ชั่วโมงก่อนให้อาหาร	62.70	58.87	0.32	0.0771
4 ชั่วโมงหลังให้อาหาร	95.11	89.57	0.35	0.0582

SEM = standard error of the mean

Peng et al. (2012) ศึกษาการใช้จุลินทรีย์ *B. subtilis natto* ในสภาพแห้ง (solid state) ให้กับโคนมในอัตรา 3 และ 6 กรัม/ตัว/วัน และพบว่า โคที่ได้รับจุลินทรีย์ทั้ง 2 อัตรา มีความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกเพิ่มขึ้นแต่มีความเข้มข้นของกรดอะซิติกในของเหลวในกระเพาะรูเมนลดลงเมื่อเทียบกับโคที่ไม่ได้รับจุลินทรีย์ นอกจากนี้ Sun et al. (2013) รายงานว่า โคที่ได้รับจุลินทรีย์ *B. subtilis natto* เป็นโพรไบโอติกในอัตรา 0.5×10^{11} - 1.0×10^{11} มีความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะรูเมนสูงกว่าโคที่ไม่ได้รับจุลินทรีย์ ความแตกต่างของชนิดสัตว์และระดับหรือความเข้มข้นของการใช้จุลินทรีย์อาจจะเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้ผลการทดลองนี้แตกต่างจากรายงานการตอบสนองต่อการเสริมจุลินทรีย์ในรายงานของ Sun et al. (2013) และ Peng et al. (2012)

ถึงแม้ว่าการใช้ *B. Subtilis* จะไม่ทำให้โคมีปริมาณของกรดอะซิติก (acetic acid, C₂) กรดโพรพิโอนิก (propionic acid, C₃) กรดบิวทีริก (butyric acid, C₄) และกรดวาเลริก (Valeric acid, C₅) มีค่าแตกต่าง (p>0.05) จากโคในกลุ่มควบคุม แต่มีแนวโน้มว่า (p<0.10) จะทำให้โคมีปริมาณกรดไขมันระเหยง่ายทั้งหมด

(total volatile fatty acids) ทั้งก่อนและหลังให้อาหาร 4 ชั่วโมงมีค่าเพิ่มขึ้น ($p=0.0771$ และ $p=0.0582$ ตามลำดับ) (ตารางที่ 4)

ค่าสัดส่วนของกรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิกและกรดบิวทีริกของการทดลองนี้มีค่าอยู่ระหว่าง 70.6-72.5% 12.3-13.3% และ 13.4-13.6% ตามลำดับ โดยสัดส่วนของกรดอะซิติกสูงกว่าค่าปกติแต่สัดส่วนกรดโพรพิโอนิกมีค่าต่ำกว่าปกติเล็กน้อย Bergman (1990) รายงานว่า สัดส่วนของกรดไขมันทั้ง 3 ชนิดควรมีค่าอยู่ระหว่าง 65-70% 20-25% และ 10-15% ตามลำดับ สาเหตุหนึ่งอาจเกิดจากการที่โคได้รับอาหารชั้นน้อยและอาหารหยาบมากจึงทำให้มีปริมาณการผลิตกรดอะซิติกมาก (Moran, 2005) ทำให้สัดส่วนของ กรดอะซิติกและกรดโพรพิโอนิก ($C_2: C_3$ ratio) มีค่าสูงถึง 5.3-5.9 ซึ่งสูงกว่าค่าเหมาะสมในกระเพาะหมักที่ควรมีค่าระหว่าง 1-4 (เมธา, 2533)

จำนวนจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน

จำนวนโปรโตซัวและแบคทีเรียในของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคทั้งสองกลุ่มแสดงในตารางที่ 5 ผลการทดลอง พบว่า ประชากรโปรโตซัวและแบคทีเรียในของเหลวในกระเพาะรูเมนจากโคทดลองทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ในทำนองเดียวกัน การใช้ *B. subtilis* ไม่มีผล ($p>0.05$) ต่อจำนวนแบคทีเรียกลุ่มที่ใช้โปรตีน (Proteolytic bacteria) แบคทีเรียกลุ่มที่ใช้อะไมโลส (Amylolytic bacteria) แบคทีเรียกลุ่มที่ใช้เยื่อใย (Cellulolytic bacteria) และแบคทีเรียกลุ่มที่มีชีวิตทั้งหมด (Viable bacteria) อย่างไรก็ตาม จำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายโปรตีนที่ 4 ชั่วโมงหลังให้อาหารในโคกลุ่มที่ได้รับ *B. subtilis* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ($p=0.0756$) กล่าวได้ว่า ระดับการใช้จุลินทรีย์ในการทดลองนี้ไม่มีผลต่อโครงสร้างหรือสัดส่วนของประชากรของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของสัตว์ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การย่อยสลายของวัตถุดิบอาหารสัตว์ในกระเพาะรูเมน ค่าชีวเคมีและนิเวศวิทยาในกระเพาะรูเมนและปริมาณการสังเคราะห์จุลินทรีย์โปรตีนของโคกลุ่มที่ใช้และไม่ใช้จุลินทรีย์ไม่แตกต่างกัน

จำนวนแบคทีเรียจากการทดลองนี้อยู่ในระดับต่ำกว่าเกณฑ์ปกติตามรายงานของ Hungate (1966) ซึ่งควรมีค่าอยู่ในช่วง 10^{10} - 10^{12} เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่จำนวนโปรโตซัวในการทดลองนี้มีค่าอยู่ในเกณฑ์ปกติในช่วง 10^5 - 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (สุริยะ, 2551)

ตารางที่ 5 จำนวนโปรโตซัวและแบคทีเรียในของเหลวจากกระเพาะรูเมน

	ใช้จุลินทรีย์	ไม่ใช้จุลินทรีย์	SEM	p-value
โปรโตซัว ($\times 10^6$ CFU/มิลลิลิตร)				
0 ชั่วโมงก่อนให้อาหาร	7.16	6.81	1.09	0.8629
4 ชั่วโมงหลังให้อาหาร	7.09	7.30	0.15	0.5000
แบคทีเรียทั้งหมด ($\times 10^9$ CFU/มิลลิลิตร)				
0 ชั่วโมงก่อนให้อาหาร	8.32	7.58	0.39	0.4148
4 ชั่วโมงหลังให้อาหาร	9.36	9.02	0.18	0.4208
Proteolytic bacteria ($\times 10^6$ CFU/มิลลิลิตร)				
0 ชั่วโมงก่อนให้อาหาร	6.22	6.05	0.08	0.2634
4 ชั่วโมงหลังให้อาหาร	6.22	5.85	0.08	0.0756
Amylolytic bacteria ($\times 10^6$ CFU/มิลลิลิตร)				
0 ชั่วโมงก่อนให้อาหาร	5.56	5.20	0.22	0.3704
4 ชั่วโมงหลังให้อาหาร	6.38	6.34	0.29	0.9233
Cellulolytic bacteria ($\times 10^6$ CFU/มิลลิลิตร)				

0 ชั่วโมงก่อนให้อาหาร	6.60	6.00	0.24	0.2139
4 ชั่วโมงหลังให้อาหาร	7.43	6.98	0.12	0.1143
Viable bacteria ($\times 10^6$ CFU/มิลลิลิตร)				
0 ชั่วโมงก่อนให้อาหาร	6.65	6.79	0.04	0.1063
4 ชั่วโมงหลังให้อาหาร	6.90	7.06	0.07	0.2589

SEM = standard error of the mean

ปริมาณจุลินทรีย์โปรตีนและเมแทบอลิซึมของไนโตรเจน

ตารางที่ 6 แสดงความเข้มข้นของอนุพันธ์พิวรีนในปัสสาวะโคทดลอง ปริมาณจุลินทรีย์โปรตีนและค่าเมแทบอลิซึมของไนโตรเจน ผลการทดลอง พบว่า การใช้และไม่ใช้จุลินทรีย์ *B. subtilis* ไม่มีผลทำให้ความเข้มข้นของอนุพันธ์พิวรีนในปัสสาวะโคทดลอง ปริมาณจุลินทรีย์โปรตีนและเมแทบอลิซึมของไนโตรเจนของโคทดลองแตกต่างกัน ($p>0.05$)

อนุพันธ์พิวรีนในปัสสาวะ (Allantoin, Uric acid, Xanthine และ Hypoxanthine) ใช้ประเมินปริมาณโปรตีนของจุลินทรีย์ที่ผลิตได้ในกระเพาะรูเมน (Chen et al., 1990) การทดลองในครั้งนี้เป็นการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ *B. subtilis* ในอาหารในอัตรา 2% ของปริมาณอาหารที่กิน (น้ำหนักสด) (ความเข้มข้นของจุลินทรีย์ *B. subtilis* เท่ากับ 1×10^6 CFU) โดยที่ปริมาณโปรตีนในอาหารไม่ต่างกัน จึงมีผลทำให้ปริมาณไนโตรเจนที่กินได้ รวมถึงปริมาณไนโตรเจนในมูลและปัสสาวะไม่แตกต่างกัน ส่งผลให้ไนโตรเจนที่ดูดซึมได้และกักเก็บในร่างกายไม่แตกต่างกันด้วย แสดงให้เห็นว่า การใช้ *B. subtilis* 2% ไม่ได้ช่วยให้มีการสร้างปริมาณจุลินทรีย์โปรตีนเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 6 อนุพันธ์พิวรีนในปัสสาวะของโคทดลองและเมแทบอลิซึมของไนโตรเจน

	ใช้จุลินทรีย์	ไม่ใช้จุลินทรีย์	SEM	p-value
ความเข้มข้นของ Creatinine ในปัสสาวะ (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	1,289	1,302	256	0.9771
ความเข้มข้นของ Allantoin ในปัสสาวะ (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	392	392	34	0.9994
ความเข้มข้นของ Uric acid ในปัสสาวะ (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	150	134	25	0.7438
ความเข้มข้นของอนุพันธ์พิวรีนในปัสสาวะ (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	541	526	58	0.8856
ความเข้มข้นของไนโตรเจนในปัสสาวะ (%)	0.61	0.53	0.07	0.8979
ปริมาณปัสสาวะ (กิโลกรัม/วัน)	16.45	15.95	2.14	0.8998
ปริมาณอนุพันธ์พิวรีนในปัสสาวะ (กรัม/วัน)	7.16	7.21	0.66	0.9679
ปริมาณจุลินทรีย์โปรตีน (กรัม/วัน)	3.01	3.25	2.89	0.9648
ปริมาณไนโตรเจนที่กิน (กรัม/ตัว/วัน)	129	128	0.0001	0.1560
ปริมาณไนโตรเจนในมูล (กรัม/ตัว/วัน)	32	37	0.002	0.3440
ปริมาณไนโตรเจนในปัสสาวะ (กรัม/ตัว/วัน)	100	70	0.007	0.2048
ไนโตรเจนที่ดูดซึม (%)	75.56	71.58	1.17	0.2577
ไนโตรเจนที่เก็บกักในร่างกาย (%)	-0.91	16.18	4.00	0.2089

SEM = standard error of the mean

สรุปผลการทดลอง

การใช้จุลินทรีย์ *B. subtilis* ที่มีความเข้มข้น 1×10^6 CFU/มิลลิลิตร ให้กับโคเนื้อลูกผสมบราห์มันในอัตรา 2% ของปริมาณอาหารที่กินและให้โคกินอาหารในระดับเพื่อการดำรงชีพ (หรือโคได้รับจุลินทรีย์จำนวน 4.02×10^8 CFU/ตัว/วัน) ไม่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารสัตว์และกระบวนการหมักรวมถึงสัดส่วนของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนและไม่มีผลกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของไนโตรเจน สรุปได้ว่า คุณประโยชน์ด้านการเพิ่มประสิทธิภาพด้านอาหารสัตว์ของการใช้จุลินทรีย์ *B. subtilis* เป็นโพรไบโอติกสำหรับโคเนื้อในระดับข้างต้นยังไม่มีผลชัดเจน ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นและระดับการใช้จุลินทรีย์ *B. subtilis* เป็นโพรไบโอติกในโคเนื้อในระดับที่เหมาะสมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบริษัทฟิโอฟอสฟอรัสอินทรีย์ จำกัด ที่สนับสนุนจุลินทรีย์ *B. subtilis* สำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณทองสุข เจตนา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ห่อนุพันธ์พีวรีน ขอขอบคุณ ดร.สุกัญญา คำพะแย ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนามาตรฐานอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินงาน ขอขอบคุณชาญชิต ยลฉวิล ที่ช่วยเก็บข้อมูล ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่งานวิเคราะห์อาหารสัตว์ ศูนย์วิจัยและพัฒนามาตรฐานอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องในการวิเคราะห์ผลทางเคมี และขอบคุณคณะกรรมการวิชาการสำนักพัฒนาอาหารสัตว์ที่ให้คำแนะนำในการแก้ไขผลงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2544ก. ฐานแห่งเอกสารคำแนะนำ. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. พิมพ์ครั้งที่ 1. 23 หน้า.
- กรมปศุสัตว์. 2544ข. ฐานหมัก. เอกสารคำแนะนำ. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. พิมพ์ครั้งที่ 1. 23 หน้า.
- กรมปศุสัตว์. 2553ก. ถั่วท่าพระสไตโล. เอกสารคำแนะนำ. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. พิมพ์ครั้งที่ 1. 20 หน้า.
- กรมปศุสัตว์. 2553ข. พืชอาหารสัตว์พันธุ์ดี. เอกสารคำแนะนำ. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. พิมพ์ครั้งที่ 5 (ฉบับปรับปรุง). 36 หน้า.
- คณะกรรมการจัดทำมาตรฐานอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องของประเทศไทย. 2551. ความต้องการโภชนะของโคเนื้อในประเทศไทย. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- เมธา วรรณพัฒน์. 2533. โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. ฟินนี่พลับลิชชิง. กรุงเทพฯ.
- วรรณภา อ่างทอง สดุดี พงษ์เพียจันทร์ และ วรุณี พานิชผล. 2547. ตารางคุณค่าทางโภชนะของวัตถุดิบอาหารสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ. 37 หน้า
- วลัยกานต์ เจริญเจตจรัญ สุวรรณ เกศกมลลาสน์ และ สดุดี พงษ์เพียจันทร์. 2559. การรวบรวมและจัดทำข้อมูลด้านคุณค่าทางโภชนะของวัตถุดิบอาหารสัตว์. สำนักพัฒนาอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 38 หน้า.

- ไวรุจน์ เดชมหิทุกุล จันทรจิรา อยู่คง กนกวรรณ พุ่มพุทรา แสงชัย เอกประทุมชัย และ เพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตร
 แสง. 2550. การศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตสปอร์ *Bacillus subtilis* เพื่อเป็นโปรไบโอติก
 ในสัตว์. วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. 30: 251-259.
- สินีนาก พลโยราช และ เมธา วรรณพัฒน์. 2558. ศักยภาพในการใช้ยีสต์เป็นแหล่งโปรไบโอติกส์ในสัตว์เคี้ยว
 เอื้อง. วารสารแก่นเกษตร. 43: 191-206.
- สุริยะ สะวานนท์. 2551. จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพด้านจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน. โรงพิมพ์สำนัก
 ส่งเสริมและฝึกอบรม กำแพงแสน. พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน,
 นครปฐม.
- AOAC. 2016. Official methods of analysis. 20th ed. Association of Official Analytical Chemists,
 Washington DC, USA.
- Balcells, J., D.S. Parker, D.S. Sarker, J.A. Guada and J.M. Peiro. 1992. Simultaneous analysis of
 allantoin and oxipurines in biological fluids by high performance liquid
 chromatography. J. Chromatography-Biomed. Applications. 575: 153-157.
- Barbosa, A.M., R.F.D. Valadares, S.C.R.F., Valadares Filho, D.S.S.C., Pina, E.D.S., Detmann and
 M.I. Leao. 2011. Endogenous fraction and urinary recovery of purine derivatives
 obtained by different methods in Nelore cattle. J. Anim. Sci. 89: 510-519.
- Bergman, E.N. 1990. Energy Contributions of Volatile Fatty Acids from the Gastrointestinal Tract
 in various species. Physiological Rev. 70: 567-590.
- Boucher, S.E., R.S. Ordway, N.L. Whitehouse, F.P. Lundy, P.J. Kononoff and C.G. Schwab. 2007.
 Effect of incremental urea supplementation of a conventional corn silage-based diet
 on ruminal ammonia concentration and synthesis of microbial protein. J. Dairy Sci. 90:
 5619-5633.
- Bremner, J.M. and D.R. Keeney. 1965. Steam distillation methods for determination of
 ammonium, nitrate and nitrite. Analytica Chimica Acta. 32: 485-495.
- Broderick, G.A. and R.E. Muck. 2009. Effect of alfalfa silage storage structure and rumen-
 protected methionine on production in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 92: 1281-1289.
- Chen, X.B. and M.J. Gomez. 1995. Estimation of Microbial Protein Supply to Sheep and Cattle
 Based on Urinary Excretion of Purine Derivatives-An Overview of the Technical Details.
 Occasional Publication 1992, International Feed Resources Unit, Rowette Research
 Institute, Aberdeen, UK.
- Eardman, R.A., G.H. Proctor and J.H. Vandersall. 1986. Effect of rumen ammonia concentration
 on "in situ" rate and extent of digestion of feedstuffs. J. Dairy Sci. 69: 2312-2320.
- Fajardo, P., L. Pastrana, J. Mendez, I. Rodriguez, C. Fucinos and N.P. Guerra. 2012. Effects of
 feeding of two potentially probiotic preparations from lactic acid bacteria on the
 performance and faecal microflora of broiler chickens. Sci. World J. Art. No. 562-635.
- Fujihara, T., E.R. Ørskov and P.J. Reeds. 1987. The effect of protein infusion on urinary excretion
 of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. J. Agric. Sci. 109: 7-12.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378.

- Galyaen, M. 1989. Laboratory Procedures in Animal Nutrition Research. New Mexico State University.
- Hungate, R. E. 1966. The Rumen and Its Microbe. Academic Press, New York. NY. 533 p.
- Lazzarini, I., E. Detmann, C.B. Sampaio, M.F. Paulino, S.C. Valadares Filho, M.A.de Souza and F. A. Oliveira. 2009. Intake and digestibility in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogenous compounds. R. Bras. Zootec. 38: 2021–2030.
- Manhar, A.K., Y. Bashir, D. Saikia, D. Nath, K. Gupta, B.K. Konwar, R. Kumar, N.D. Namsa and M. Mandal. 2016. Cellulolytic potential of probiotic *Bacillus Subtilis* AMS6 isolated from traditional fermented soybean (Churpi): An in-vitro study with regards to application as an animal feed additive. Microb. Res. 186–187: 62-70.
- Moran, J. 2005. Chapter 5: how the rumen works. Tropical dairy farming: Feeding management for small dairy farmers in the humid tropics. Landlinks Press. Collingwood, Australia.
- Ogimoto, K. and S. Imai. 1981. Atlas of rumen microbiology. Japan Scientific Press. Tokyo, Japan.
- Ørskov, E.R. and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements to the rate of passage. J. Agric. Sci. 92: 449-503.
- Ørskov, E.R. and M. Ryle. 1998. Energy nutrition in ruminants. Lincoln: Chalcombe Publications.
- Peng, H., J.Q. Wang, H.Y. Kang, S.H. Dong, P. Sun, D.P. Bu and L.Y. Zhou. 2012. Effect of feeding *Bacillus subtilis natto* fermentation product on milk production and composition, blood metabolites and rumen fermentation in early lactation dairy cows. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 96: 506-512.
- Reid, G. 2008. Review: probiotics and prebiotics – progress and challenges. Int. Dairy J. 18: 969–975.
- Sanders, W.L. and P.J. Gaynor. 1987. Analysis of switchback data using Statistical Analysis System. Inc. ^(R) Software. J. Dairy Sci. 70: 2186 – 2191.
- Souza, V.L., N.M. Lopes, O.F. Zacaroni, V.A. Silveira, R.A.N. Pereira, J.A. Freitas, R. Almeida, G.G.S. Salvati and M.N. Pereira. 2017. Lactation performance and diet digestibility of dairy cows in response to the supplementation of *Bacillus subtilis* spores. Livest. Sci. 200: 35-39.
- Sun, P., J.Q. Wang and L.F. Deng. 2013. Effects of *Bacillus subtilis natto* on milk production, rumen fermentation and ruminal microbiome of dairy cows. Animal 7: 216–222.
- Valadares, R.F.D., G.A. Broderick, S.C. Valadares and M.K. Clayton. 1999. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. J. Dairy Sci. 82: 2686–2696.
- Velásquez, A.V., G.G., da Silva, D.O. Sousa, C.A. Oliveira, C.M.M.R., Martins, P.P.M., dos Santos, J.C.C., Balieiro, F.P. Rennó and R.S. Fukushima. R.S. 2018. Evaluating internal and external markers versus fecal sampling procedure interactions when estimating intake in dairy cows consuming a corn silage-based diet. J. Dairy Sci. 101: 5890-5901.

- Vieira, V.A., M.P. Sforcini, V. Endo, G.C. Magioni and M.D.S. Oliveira. 2014. Influence of probiotics on dairy cows' diet. *Int. J. Agric. & Biol. Eng.* 8: 786-789.
- Xu, H., H. Weiqiang, H. Qiangchuan, K. Lai-yu, S. Zhihong, M. Huimin, Z. Feiyan, L. Yuan-Kun and Z. Heping. 2017. The effects of probiotics administration on the milk production, milk components and fecal bacteria microbiota of dairy Cows. *Science Bulletin.* 62: 767-774.
- Young, E.G. and C.F. Conway. 1942. On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. *J. Biol. Chem.* 142: 839-852.