รายงานการวิจัย ฉบับสมบูรณ์
งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2540

ชื่อโครงการ (ไทย)

การใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นโพรไบโอติกเพื่อเสริมในอาหารไก่

(อังกฤษ)

Lactic Acid Bacteria Use as Probiotics for Supplement in Chicken Feeds

หัวหน้าโครงการ ดร. สิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์
Sirirat Rengpipat Ph.D.
ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผู้ช่วยวิจัย นายฐิติพงศ์ อนะรัชติการนนท์
นางสาวปัญชลี ประคองศิลป์

จท
วท 15
009622

สรุปบทคัดย่อโครงการวิจัย : การใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นโพรไบโอติกเพื่อเสริมอาหารไก่

การแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากลำไส้ไก่ที่มีสุขภาพแข็งแรงจากตลาดสดแหล่งต่างๆในกรุงเทพมหานคร จำนวน 54 ตัวอย่าง ได้เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวนทั้งสิ้น 28 สายพันธุ์ และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *Bordetella avium, Listeria monocytogenes, Pasteurella multocida, Proteus vugalis, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium* และ *Staphylococcus aureus* พบว่าส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อของแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 6 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง โดยดูความกว้างของบริเวณยับยั้ง และเมื่อนำเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์ มาทำการจัดกลุ่มตามหลักอนุกรมวิธาน สามารถจัดอยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus acidophilus* 2 สายพันธุ์, *Lactobacillus bulgaricus* 1 สายพันธุ์ , *Lactobacillus fermentum* 1 สายพันธุ์, *Lactobacillus casei Subsp. tolerans* 1 สายพันธุ์, *Lactobacillus jensenii* 1 สายพันธุ์ และเมื่อนำเชื้อ *Lactobacillus* spp. แบบผสมไปทดลองเลี้ยงไก่ปรากฏว่า เชื้อในสกุล *Lactobacillus fermentum* ไม่สามารถเจริญอยู่รอดได้ในลำไส้ของไก่ และการศึกษาผลการให้ *Lactobacillus* spp. แบบผสมต่อสมรรถภาพในการเจริญเติบโตของไก่พบว่า ไก่กลุ่มทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสมมีน้ำหนักตัวมากกว่าไก่กลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในเรื่องของประสิทธิภาพการใช้อาหารพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อทดสอบผลการท้าทายด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* พบว่า ไก่กลุ่มที่ได้รับ*Lactobacillus* spp. แบบผสมสามารถลดการเป็นพาหะของโรคติดเชื้อ Salmonella บางชนิด

ผลที่ได้รับจากการทดลอง อาจกล่าวได้ว่าการใช้ *Lactobacillus* spp. แบบผสมมีแนวโน้มที่จะช่วยให้สมรรถภาพในการผลิตของไก่เพิ่มขึ้นได้เช่นเดียวกับสารปฏิชีวนะเร่งการเจริญเติบโตอื่นๆ และมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ทดแทนสารปฏิชีวนะที่ก่อให้เกิดผลเสียแก่ผู้บริโภค

เลขหมู่ ๓๙ ๐๓ 15
เลขทะเบียน 009622
วัน,เดือน,ปี 21 เม.ย.42

27 ต.ค. 2544

T18875522

ABSTRACT : USE OF LACTIC ACID BACTERIA AS PROBIOTIC SUPPLEMENT IN CHICKEN FEED.

The 28 Lactic Acid Bacterial strains were isolated from 54 samples of healthy chicken intestinal tracts collected from markets in Bangkok. The bacteria were then tested for antibiotic test with *Bordetella avium, Listeria monocytogenes, Pasteurella multocida, Proteus vugalis, Pseudomonas aeruginosa, Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* . The results showed that supernatant of 6 Lactic Acid Bacterial strains produced zones of inhibition on solid media. All 6 strains were taxonomically classified as 2 *Lactobacillus acidophilus* strains, 1 *Lactobacillus bulgaricus* strain, 1 *Lactobacillus fermentum* strain, 1 *Lactobacillus casei* Subsp. tolerans strain, and 1 *Lactobacillus jensenii* strain. When mixed culture of these *Lactobacillus* spp. were supplemented to chickens as probiotic, *Lactobacillus fermentum* was the only strain that could not survive in chicken's intestine. In addition, the efficiency test of probiotic was conducted and showed that tested chickens, in which mixed probiotics were supplemented, had larger body weights than the control with statistical singnificance ($P<0.05$) and Feed Conversion Ratio was not significantly different. When conducting a challenging test with *Salmonella typhimurium*, it revealed that mix culture *Lactobacillus* spp. could decrease the infection of certain *Salmonella* spp.

The results from this work could be concluded that using mixed culture of *Lactobacillus* spp. as probiotics in increasing chicken production was benefitial as the same as the use of other growth promotants and could be used as alternatives for antibiotics.

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทำการคัดเลือกสายพันธุ์แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหาร และทำหน้าที่เป็นโพรไบโอติกผสมอาหารเลี้ยงไก่
2. นำอาหารผสมโพรไบโอติกเลี้ยงไก่ เพื่อติดตามการเจริญเติบโตของไก่ น้ำหนักตัวของไก่
3. การทดสอบ Challenge test เพื่อดูผลการต้านทานในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยโพรไบโอติกต่อโรคทางเดินอาหารที่เกิดจาก *Salmonella* sp.
4. ตรวจสอบ Viability ต่อเวลาการเก็บของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นโพรไบโอติกหลังจากการเก็บในรูปผงแห้ง

วิธีการดำเนินการวิจัยทดลอง (สรุป)

วิธีการดำเนินการวิจัยมีดังนี้

1. คัดกรองและแยกบริสุทธิ์แลคติกแอซิดแบคทีเรียเฉพาะชนิด *Lactobacillus* spp. จากลำไส้ไก่สุขภาพดี
2. ตรวจดูลักษณะและจัดอนุกรมวิธานของ *Lactobacillus* spp.
3. คัดเลือก *Lactobacillus* spp. ที่ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในคนและสาเหตุโรคทางเดินอาหารเฉพาะ *Salmonella typhimurium*
4. ผลิต *Lactobacillus* spp. เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติก และทำ Freeze-dried ติดตาม Viability หลังเก็บ 1 ปี โดยทดสอบแบบ MRS agar medium
5. ทดสอบภาคสนามโดยนำอาหารไก่เสริมโพรไบโอติกเลี้ยงไก่ติดตามชั่งน้ำหนัก ดูผลสุขภาพภายนอก และคำนวน FCR เปรียบเทียบกับไก่กลุ่มควบคุม
6. ทดสอบภาคสนามติดตามอัตราการรอดของกลุ่มไก่เลี้ยงด้วยอาหารไก่เสริมโพรไบโอติก หลังให้ *Salmonella typhimurium* เปรียบเทียบกับกลุ่มไก่ควบคุม

ขอบเขตการวิจัย

คัดเลือก *Lactobacillus* spp. ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก ผสมอาหารเลี้ยงไก่ ติดตามน้ำหนักตัวไก่ และทำการทดสอบ Challenge test โดยการให้ *Salmonella*

typhimurium ทางปาก และนับแบคทีเรียประจำถิ่น*Lactobacillus* spp. และ *Salmonella typhimurium* จากลำไส้

บทนำ

อาหารเนื้อสัตว์ประเภทสัตว์ปีก เช่น ไก่ สัตว์เนื้อ เช่น สุกร และสัตว์น้ำทะเล เช่น กุ้ง ปู ปลาเป็นสัตว์โปรตีนหลักที่ทำเป็นอุตสาหกรรมในบ้านและส่วนใหญ่ของผลิตผลที่ได้ถูกนำไปจำหน่ายเป็นสินค้าของประเทศเพิ่มรายได้ให้แก่อุตสาหกรรมไทย ปัญหาหลักของการเลี้ยงสัตว์ประเภทสัตว์ปีกและสัตว์เนื้อ ได้แก่ ปัญหาโรคท้องร่วงที่ส่งผลกระทบให้สัตว์เลี้ยงโตไม่เต็มที่น้ำหนักตัวน้อยกว่าเกณฑ์มาตรฐาน หรือล้มตายในวัยเจริญพันธุ์ จากการตรวจสอบเอกสารงานวิจัยพอจะสรุปผลงานในระดับห้องปฏิบัติการและระดับห้องทดลองที่นำเอาโพรไบโอติก (Probiotics) มาใช้มากกว่า 20 ปี ในการช่วยลดปัญหาโรคท้องร่วงในไก่และสุกร ประกอบกับยังได้ผลข้างเคียงเชิงบวกของโพรไบโอติกอีกหลายประการกล่าวคือให้ผลกระตุ้นการทำงานของ Macrophage และการกระตุ้นเพิ่มระดับแอนตี้บอดีในกระแสเลือด เป็นต้น

โพรไบโอติก ได้แก่จุลินทรีย์เฉพาะบางสายพันธุ์ทำหน้าที่เป็นส่วนเสริมในอาหารสัตว์ เจริญเพิ่มจำนวนในลำไส้ เพื่อทำให้เกิดการสมดุลย์ในทางเดินอาหารได้ดี นำไปใช้เลี้ยงสัตว์ประเภทเนื้อได้ ผลการให้โพรไบโอติกทำให้ได้ผลดีในแง่ของการเกิดสมดุลย์ของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารสัตว์ จุลินทรีย์ที่จัดเป็นโพรไบโอติกมีลักษณะสมบัติทนกรดในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดี จุลินทรีย์ที่ใช้ต้องเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ไม่ให้ทอกซิน (Toxin) สามารถเกาะยึดกับผิวหน้าของระบบทางเดินอาหาร เพิ่มจำนวนโคโลนีของเซลล์ (Viability and Colony Increase) สามารถผลิตเอนไซม์ สารเมตาบอไลท์ที่มีประโยชน์ต่อบริเวณที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่ ในปัจจุบันบ้านเราได้มีผู้ทดลองโดยนำโพรไบโอติกที่ผลิตจากต่างประเทศที่มีจำหน่ายในท้องตลาดในหลายลักษณะกล่าวคือ รูปผง เม็ด แคปซูล แผ่นเกล็ด และก้อนเคิร์ด (curd) ที่มีราคาค่อนข้างแพงมาใช้ผสมอาหารสัตว์ เพื่อลดปัญหาโรคท้องร่วงในไก่และหมู

ปัจจุบันการเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยมีการขยายตัวจากการเลี้ยงในครัวเรือน มาเป็นการเลี้ยงเพื่อการค้ามากขึ้น ดังนั้นจึงนิยมใช้อาหารสัตว์สำเร็จรูปเพิ่มขึ้น เนื่องจาก

เป็นการสะดวก ประหยัดเวลาและให้ผลคุ้มค่ามากกว่า อาหารสำเร็จรูปส่วนใหญ่มักจะผสมสารปฏิชีวนะเพื่อช่วยเร่งอัตราการเจริญเติบโตของสัตว์ และป้องกันโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหารในสัตว์ แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารปฏิชีวนะในอาหารสัตว์เป็นเวลานานๆ จะก่อให้เกิดการดื้อยาของจุลินทรีย์เกิดขึ้น ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญปัญหาหนึ่งต่อการเลี้ยงสัตว์และวงการสัตวแพทย์ เนื่องจากสมบัติการดื้อยานี้อาจถ่ายทอดไปยังจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ซึ่งก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์ได้ จึงได้มีคนพยายามแก้ปัญหานี้ โดยการทดลองใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรียเสริมอาหารสัตว์แทนสารปฏิชีวนะ แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จะใช้เสริมอาหารสัตว์ได้นั้นจะต้องมีสมบัติที่เหมาะสมหลายประการด้วยกันคือ สามารถอยู่รอดและเจริญในลำไส้สัตว์ และต้องมีความสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคกับระบบทางเดินอาหาร ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถทนต่อสภาวะต่างๆ ในระบบทางเดินอาหารไก่และเจริญได้ดีในลำไส้ของไก่ส่งผลต่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของไก่

วิธีการดำเนินงานวิจัย

แผนภูมิการทดลองใช้ *Lactobacillus* spp. เป็นโพรไบโอติกเสริมอาหารไก่

ลำไส้จากไก่ที่ได้จากตลาดสดแหล่งต่างๆ จำนวน 54 ตัวอย่าง

⇓ นำมาแยก *Lactobacillus* spp. ใน MRS broth 37°เซลเซียส 24 ชั่วโมง
ได้ *Lactobacillus* spp. ทั้งสิ้น 28 สายพันธุ์

⇓ นำส่วนน้ำใสของน้ำเลี้ยง *Lactobacillus* spp. แต่ละชนิดหลังปรับ pHให้เป็นกลางมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในไก่

สามารถคัดเลือก *Lactobacillus* spp. ทั้งสิ้น 6 สายพันธุ์ (CU 1-6)

⇓ นำมาทดสอบความสามารถใน
การใช้คาร์โบไฮเดรทชนิดต่างๆ

CU. 1 = *Lactobacillus acidophilus*

CU. 2 = *Lactobacillus bulgaricus*

CU. 3 = *Lactobacillus fermentum*

CU. 4 = *Lactobacillus acidophilus*

CU. 5 = *Lactobacillus casèi subsp. tolerans*

CU. 6 = *Lactobacillus jensenii*

⇓ 1. นำไปทดสอบความสามารถใน
การทนเกลือแกงและเกลือน้ำดี

Lactobacillus spp. ทั้ง 6 สายพันธุ์ ทนต่อเกลือแกง
และเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูงถึง 5 เปอร์เซ็นต์
(รายงานโดยละเอียดในรายงานประจำปี 2539)

⇓ นำไปทดสอบความสามารถ
ในการอยู่รอดในลำไส้ของไก่

คัดเลือก *Lactobacillus* spp. ได้ 5 สายพันธุ์ (ยกเว้น CU. 3)

⇓ นำไปทดสอบดูผลของโพรไบโอติก
ต่อการเจริญเติบโตของไก่

<u>ผลที่ได้รับ</u>

1.*ไก่กลุ่มที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสมมีน้ำหนักตัวดีกว่าไก่กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2.*ไก่กลุ่มที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสมมีแนวโน้มการใช้อาหารดีกว่าไก่กลุ่มควบคุมแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

⇓ การทดสอบท้าทายด้วย

Salmonella typhimuriun

3. *ไก่กลุ่มที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. สามารถลดจำนวนของ *Salmonella typhimurium* ในระบบทางเดินอาหารได้

Note : Lyophillizer *Lactobacillus* spp. ทั้ง 5 สายพันธุ์ หลังจากเก็บในสภาพผงแห้งที่ -20 °C Viability หลังเก็บ 2 ปี พบว่า Viability ของ *Lactobacillus* spp. มี > 97% (รายงานโดยละเอียดในรายงานหกเดือนแรกของปี 2539-2540)

การทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้

การเตรียม Agar plate เอา Agar Medium (45-50 °เซลเซียส) ลงใน plate ทิ้งไว้จนแข็งตัวเริ่มต้นโดยการแตะเชื้อ *Lactobacillus* spp. 4-5 โคโลนี เพาะลงบน MRS broth บ่มไว้ที่ 37°เซลเซียส เทียบความขุ่นเทียบเท่า Mc Farland เบอร์ 0.5 (2-8 ชั่วโมง) ถ้าความขุ่นเกิน ปรับโดยทำให้เจือจางลง แล้วใช้สำลีพันปลายไม้จุ่มแตะเชื้อ *Lactobacillus* spp. ขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่เตรียมไว้ ในลักษณะ 3 ทิศทาง แต่ละทิศวางมุม 60 องศา แล้ววางดิสค์แต่ละแผ่นห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 15 มิลลิเมตร ห่างกัน 15-20 มิลลิเมตร คว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 37° เซลเซียส 24-48 ชั่วโมง นำมาอ่านผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสเทียบกับค่ามาตรฐานที่กำหนด

การหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะ (Mininal Inhibitory Concentration,MIC) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* spp.

นำ Stock Solution ของสารปฏิชีวนะชนิดที่ต้องการทดสอบ (1,000 mcg/ml) มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 50 mcg/ml จากนั้นให้ทำ two fold dilution ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 mcg/ml แล้วให้ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่ต้องการทดสอบใส่ลงใน MRS broth ที่มีความเข้มข้นของยาแตกต่างกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37

°เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาตรวจสอบว่าหลอดไหนที่เชื้อเริ่มไม่เจริญหลอดนั้นคือ MIC (ดูการเจริญของเชื้อโดยดูจากความขุ่นของหลอดและดูการเปลี่ยนสีของบรอมเครซิล เพอเพิล จากสีม่วงเป็นเหลือง)

<u>การทดสอบภาคสนามเพื่อดูการอยู่รอดของ *Lactobacillus* spp. แบบผสม 6 สายพันธุ์จากลำไส้ไก่</u>

โดยทำการเลี้ยง *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ (CU 1-6) นำมาเลี้ยงที่ 37° เซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วปั่นแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อออกไปจากนั้นจึงเติม 0.85 % NSS แล้วนำมาทำ Total viable cell count ดูว่า stock เชื้อแต่ละสายพันธุ์มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นเท่าไร แล้วจึงนำมาปรับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ 0.85% NSS ให้แต่ละสายพันธุ์มีจำนวน viable cell เป็น10^4, 10^5, 10^6 เซลล์/มล. ตามลำดับ จากนั้นจึงนำเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่เตรียมได้นำไปให้ไก่กินวันละ 1 มล./ตัว/สายพันธุ์ ป้อน *Lactobacillus* spp. ใส่ปากให้ไก่กินโดยตรง โดยแบ่งไก่ออกเป็น 7 กลุ่มๆ ละ 32 ตัว โดย 1 กลุ่ม เป็น control ไม่ให้กินเชื้อ 1 กลุ่ม และอีก 3 กลุ่ม จะให้ *Lactobacillus* spp. แบบผสม (mix culture) 10^4, 10^5, 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ โดยให้กิน 3 วันต่อครั้ง ส่วนอีก 3 กลุ่ม ให้กิน *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ผสม (mix culture) 10^4, 10^5, 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ โดยให้กินทุกวัน และทุกๆ 5 วัน จะทำการฆ่าไก่กลุ่มทดสอบ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และกลุ่มควบคุม (Control) โดยสุ่มฆ่ากลุ่มละ 3 ตัว เพื่อนำลำไส้ไก่มาทำ Total viable cell count ของแบคทีเรียประจำถิ่น และ *Lactobacillus* spp.

<u>การทดสอบภาคสนามเพื่อดูผลของ *Lactobacillus* spp. ต่อการเจริญเติบโตของไก่</u>

ใช้ไก่แรกเกิดอายุ 1 วัน ทำการเลี้ยง 42 วัน โดยแบ่งไก่เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเราจะให้เป็นกลุ่มควบคุม (ไม่กิน *Lactobacillus* spp.) จำนวน 64 ตัว ส่วนกลุ่มที่สองจำนวน 64 ตัว จะให้เป็นกลุ่มที่กินเชื้อ *Lactobacillus* spp. แบบผสม (Mixed culture) ของ *Lactobacillus* spp. จำนวน 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ โดยจะให้ลูกไก่กินเชื้อทุกๆ 3 วัน โดยใช้วิธีการเตรียม*Lactobacillus* spp. แล้วป้อนใส่ปากให้ไก่กินโดยตรง ตัวละ 1 มล./ตัว/

สายพันธุ์/วัน และทำการชั่งน้ำหนักไก่ทุก 7 วัน ทั้งกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ให้กินเชื้อ เพื่อดูอัตราการเจริญเติบโตเปรียบเทียบกันทุกๆสัปดาห์ และทุกๆ สัปดาห์จะทำการฆ่าไก่กลุ่มควบคุมและกลุ่มกิน *Lactobacillus* spp. กลุ่มละ 3 ตัว เพื่อนำเอาลำไส้ไก่มาทำ Total viable cell count ของแบคทีเรียประจำถิ่น และ *Lactobacillus* spp. ทำการชั่งน้ำหนักไก่ครั้งสุดท้ายทั้ง 2 กลุ่ม และชั่งน้ำหนักอาหารที่ไก่กินเหลือ เพื่อนำมาคำนวณหาประสิทธิภาพการใช้อาหาร (FCR) เปรียบเทียบระหว่างไก่ 2 กลุ่มว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่

$$\text{Feed Conversion Ratio (FCR)} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่ไก่กิน}}{\text{น้ำหนักของไก่ที่เพิ่มขึ้น}}$$

<u>การวิเคราะห์ทางสถิติ</u>

นำข้อมูลน้ำหนักเฉลี่ยของไก่ เมื่อเลี้ยงอายุ 42 วันของทั้ง 2 กลุ่ม นำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธีวิเคราะห์การเปรียบเทียบสองตัวแทนแบบ Difference two population means น้ำหนักทั้ง 2 กลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่

<u>การทดสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ต่อการต้านทานการติดเชื้อ *Salmonella typhimurium* ในไก่</u>

การทดสอบนี้ทำโดยใช้เชื้อ *Salmonella typhimurium* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารของไก่โดยรับการอนุเคราะห์จากคณะสัตวแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยการทดสอบครั้งนี้จะใช้ขนาดของเชื้อ *Salmonella typhimurium* จำนวน 10^3 เซลล์/มล. ซึ่งเป็นขนาด LD_{50} ในหนูขาวและใช้ลูกไก่แรกเกิดอายุ 1 วัน ทำการเลี้ยง 25 วัน โดยแบ่งลูกไก่เป็น 8 กลุ่มทดสอบกลุ่มละ 32 ตัว ดังนี้ คือ

กลุ่มทดสอบควบคุม = กลุ่มทดสอบที่ไม่ให้กินเชื้อ *Lactobacillus* spp. แบบผสม และ *Salmonella typhimurium*

กลุ่มทดสอบโพรไบโอติก(P) = กลุ่มทดสอบที่ให้กินเชื้อ *Lactobacillus* spp. แบบผสม

และ *Salmonella typhimurium*

กลุ่มทดสอบโพรไบโอติก(P) = กลุ่มทดสอบที่ให้กินเชื้อ *Lactobacillus* spp. แบบผสม จำนวน 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วัน

การทดสอบนี้จะทำการสุ่มฆ่าไก่ ทุก 5 วัน กลุ่มทดสอบละ 3 ตัว เพื่อนำลำไส้ไก่มาทำ Total viable cell count ของแบคทีเรียประจำถิ่น, *Lactobacillus* spp., *Salmonella typhimurium*

สถานที่ทดลอง

การเตรียมแลคติกแอซิดแบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ฟาร์มทดลองใช้โรงเรือนเลี้ยงไก่ของบริษัท กรุงเทพอาหารสัตว์ จำกัด กม. 21 ถนนบางนา-ตราด

กรงเลี้ยงที่ใช้มีขนาด 92" 37" สูง 12" วางซ้อนกัน 3 ชั้นใช้เลี้ยงลูกไก่ตั้งแต่อายุ 1 วัน ถึง 6 สัปดาห์ ภายในกรงให้ความร้อนโดยใช้หลอดไฟขนาด 60 แรงเทียน กรงละ 1 ดวง ให้น้ำและอาหารกินตลอดเวลา

เครื่องชั่งน้ำหนักตัวของไก่ ใช้เครื่องชั่งแบบ Berkal ตลอดทั้ง 6 สัปดาห์

รางน้ำรางอาหารใน 2 สัปดาห์แรก ให้น้ำและอาหารภายในกรงและให้ในรางนอกกรง เมื่ออายุ 2-6 สัปดาห์

พันธุ์ไก่และอาหารไก่

ลูกไก่พันธุ์ CB-12-95 CN เพศผู้

อาหารช่วง 1-19 วันใช้อาหารสูตร CB-I-751

อาหารช่วง 20-42 วันใช้อาหารสูตร CB-I-752

การเก็บรักษาจุลินทรีย์

เลี้ยง *Lactobacillus* spp. ใน MRS broth เก็บเกี่ยวจุลินทรีย์ที่ Log phase ผสม 10% skim milk อัตราส่วน 1:1 และนำไปทำ freeze-dried เก็บผงที่ได้ที่ -20 °C นำมาตรวจดู viability จนครบ 1 ปี

ผลการทดลองและบทวิจารณ์

จากรายงานประจำปี 2539 ได้สรุป ชนิด และจำนวนสายพันธุ์ *Lactobacillus* spp. ที่จัดกลุ่มอนุกรมวิธานตามความสามารถในการใช้น้ำตาลดัง Table 1 และสายพันธุ์เหล่านี้มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 1 : Carbohydrate fermentation pattern of *Lactobacillus* spp. isolated from GI tract of chickens

Strain / Fermentation[a] of	L. lactis (TISTR452)	CU. 1	CU. 2	CU. 3	CU. 4	CU.5	CU. 6
Amydalin	-	+	-	-	+	-	+
Arabinose	-	-	-	+	-	-	-
Cellobiose	-	+	-	-	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+
Glucose (Acid)	+	+	+	+	+	+	+
Glucose (Gas)	-	-	-	+	-	-	-
Gluconate	-	+	-	+	+	+	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	-
Maltose	+	+	-	+	+	-	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-
Mannose	+	+	-	+	+	+	+
Sucrose	+	+	-	w	+	-	+
Sorbital	-	-	-	-	-	+	-
Ribose	-	-	-	+	-	+	-
Homofermentative	+	+	+	-	+	+	+
Heterofermentative	-	-	-	+	-	-	-

a + = Positive , - = Negative, w = Weak Carbohydrate (1 % w/v) were supplemented to carbohydrate fermentation medium (Modified of MRS broth) (Sharpe,1968) . *Lactobacillus lactis* (TISTR 452) from BANGKOK MIRCEN was employed as control.

CU. 1 = *Lactobacillus acidophilus* CU. 4 = *Lactobacillus acidophilus*

CU. 2 = *Lactobacillus bulgaricus* CU. 5 = *Lactobacillus casei* Subsp. *tolerans*

CU. 3 = *Lactobacillus fermentum* CU. 6 = *Lactobacillus jenseni*

การทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้ (Agar Diffusion method)

การทดสอบการต้านทานสารปฏิชีวนะโดยวิธีนี้จะทำการวางแผ่นสารปฏิชีวนะ (แผ่นกระดาษกรองเล็กๆที่ชุบสารปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นตามที่ตั้งมาตรฐานไว้)ชนิดต่างๆลงบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโดยวางแผ่น ให้ห่างกันพอสมควรเพื่อให้อ่านผลได้ชัดเจน หลังจากเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37° เซลเซียส 18-24 ชั่วโมงโดยการทดสอบครั้งนี้ใช้สารปฏิชีวนะทั้งสิ้น 14 ชนิด ซึ่งผลการทดลองปรากฏว่าสารปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบแต่ละชนิดจะให้ผลการยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 6 สาย(ตารางที่ 1) พันธุ์ แตกต่างกันไป โดยการแปลผลความกว้างของบริเวณยับยั้งเปรียบเทียบกับมาตรฐานของสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้กำหนดไว้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2 การทดสอบนี้เพื่อดูแนวโน้มว่าเชื้อ *Lactobacillus* spp. 6 สายพันธุ์ เมื่อผสมกับอาหารที่มีสารปฏิชีวนะเชื้อ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 6 สายพันธุ์จะสามารถอยู่รอดได้หรือไม่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 2. Sensitivity test of antibiotics on *Lactobacillus* spp.

Antibiotics	Potency	*Lactobacillus* spp.					
		CU. 1	CU. 2	CU. 3	CU. 4	CU. 5	CU. 6
Ampicillin	10 mcg.	I	S	I	S	I	S
Amikacin	30 mcg.	I	S	R	R	R	I
Bacitracin	10 Unit	S	S	S	S	S	S
Cefazalin	30 mcg.	S	I	I	I	I	S
Chloramphenical	30 mcg.	S	S	S	S	S	S
Gentamycin	10 mcg.	I	S	R	R	R	I
Lincomycin	30 mcg.	I	R	S	I	S	R
Neomycin	30 mcg.	R	I	R	R	S	I
Novobiocin	30 mcg.	S	S	R	S	S	S
Penicillin	10 Unit	S	S	I	S	S	S
Streptomycin	10 mcg.	R	R	R	S	S	S
Sulfamethazine	250 mcg.	R	R	R	R	R	R
Tetracyclin	30 mcg.	S	S	S	S	R	S
Vancomycin	30 mcg.	R	R	R	S	R	R

CU. 1 = *Lactobacillus acidophilus*

CU. 2 = *Lactobacillus bulgaricus*

CU. 3 = *Lactobacillus fermentum*

CU. 4 = *Lactobacillus acidophilus*

CU. 5 = *Lactobacillus casei* Subsp. *tolerans*

CU. 6 = *Lactobacillus jensenii*

S = Sensitive

I = Intermediate

R = Resistance

การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้

การทดสอบนี้กระทำเพื่อต้องการทราบว่าถ้าใช้ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะต่ำลงจากขนาดความแรงของยาที่กำหนดในแผ่นมาตรฐานที่ความเข้มข้นใดที่เป็นความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะเริ่มต้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ*Lactobacillus* spp. ที่แยกได้โดยการทดสอบกับสารปฏิชีวนะทั้งสิ้น 6 ชนิด ซึ่งสารปฏิชีวนะทั้ง 6 ชนิด นี้เป็นที่นิยมใส่ผสมกับอาหารสัตว์ ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 3. Minimum Concentration (MIC) of antibiotics on *Lactobacillus* spp.

Antibiotics	Concentration of antibiotics (mcg/ml)									*L. spp*
	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.125	6.25	12.5	25	
Ampicillin	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 1
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	CU. 2
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	CU. 3
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 4
	+	+	+	+	+	-	-	-	-	CU. 5
	+	+	+	+	+	-	-	-	-	CU. 6
Chloramphenical	+	+	+	+	+	+	+	+	-	CU. 1
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	CU. 2
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	CU. 3
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	CU. 4
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	CU. 5
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	CU. 6
Cloxacillin	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 1
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	CU. 2
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	CU. 3
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 4
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 5
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 6

Table 3 (continued). Minimum Concentration (MIC) of antibiotics on *Lactobacillus* spp.

Antibiotics	Concentration of antibiotics (mcg/ml)									*L. spp*
	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.125	6.25	12.5	25	
Gentamycin	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 1
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	CU. 2
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	CU. 3
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 4
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	CU. 5
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 6
Kanamycin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	CU. 1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	CU. 2
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	CU. 3
	+	+	+	+	+	+	-	+	+	CU. 4
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	CU. 5
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	CU. 6
Streptomycin	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 1
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 2
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	CU. 3
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 4
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 5
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	CU. 6

+ = Growth

- = No Growth

<u>การทดสอบภาคสนามเพื่อดูการอยู่รอดของ *Lactobacillus* spp. แบบผสม 6 สายพันธุ์จากลำไส้ไก่</u>

ใช้ลูกไก่พันธุ์ CB-12-95 CN เพศผู้ อายุ 1 วัน จำนวนทั้งหมด 224 ตัว แบ่งลูกไก่ออกเป็น 7 กลุ่มๆ ละ 32 ตัว ใช้เวลาในการเลี้ยง 19 วัน แบ่งกลุ่มไก่ดังนี้คือ กลุ่มควบคุม (Control) 1 กลุ่ม อีก 6 กลุ่มเป็นลูกไก่ที่ได้รับ *Lactobacillus* spp. โดยการเตรียม *Lactobacillus* spp. โดยป้อนใส่ปากให้ไก่กินโดยตรง (Direct Force Feed) สุ่มไก่มาฆ่าทุก 5 วันของการเลี้ยงเพื่อนำลำไส้มาตรวจหาจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่นและจำนวน *Lactobacillus* spp. ดังผลตาม ตารางที่ 4 และ 5 ซึ่งแสดงให้เห็นการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นของไก่อายุ 1, 5, 10, 15 และ 19 วันของการเลี้ยง ปรากฏว่าไก่กลุ่มควบคุมที่อายุ 1 วัน พบจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่น 3.8×10^{2} เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ ซึ่งเป็นตัวแทนค่าแบคทีเรียประจำถิ่นของทุกๆกลุ่มทดสอบ แบคทีเรียประจำถิ่นพบว่ามีจำนวนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนสิ้นสุดการทดลองวันที่ 19 โดยจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นของไก่กลุ่มควบคุมคือ 5.8×10^{9} เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบในวันแรกของการเลี้ยง 7 เท่าตัว แสดงว่าไก่ได้รับแบคทีเรียประจำถิ่นเป็นประจำทำให้แบคทีเรียเหล่านั้นมีการเพิ่มจำนวนครอบครองพื้นที่ผิวของลำไส้ไก่เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ผลการนับจำนวนของ*Lactobacillus* spp. ในไก่กลุ่มควบคุม (ตารางที่ 5) ปรากฏว่า เริ่มพบแบคทีเรียประจำถิ่นที่เป็น *Lactobacillus* spp. ในวันแรกของการเลี้ยงแต่จำนวนยังน้อยมากๆจนไม่สามารถรายงานผลได้ (<10 estimate) แต่จะมาพบมากจนสามารถรายงานผลได้ในวันที่ 19 ของการเลี้ยง 4.8×10^{2} เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ (ตารางที่ 5) โดยปกติ *Lactobacillus* spp. เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในลำไส้ไก่ทั่วไป

ตารางที่ 6 ยืนยันได้ว่า *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ป้อนให้ไก่กิน 5 สายพันธุ์ (ยกเว้นสายพันธุ์ CU. 3) สามารถอยู่รอดได้ในลำไส้ไก่จริง นั่นคือ *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ให้สามารถที่จะใช้เป็นโพรไบโอติกได้

Table 4. Total bacterial in gastrointestinal tract of chickens

Age (days)	cfu/gm. of GI tract Tested Groups						
	1	2	3	4	5	6	Control
1	-	-	-	-	-	-	3.8×10^{2}
5	4.5×10^{4}	1.9×10^{6}	1.3×10^{5}	3.9×10^{4}	3.2×10^{4}	3.0×10^{7}	5.5×10^{5}
10	9.2×10^{6}	2.4×10^{7}	7.3×10^{7}	4.2×10^{6}	9.4×10^{7}	1.6×10^{9}	6.5×10^{9}
15	1.6×10^{8}	4.6×10^{7}	9.2×10^{8}	6.0×10^{8}	1.6×10^{9}	9.4×10^{10}	8.2×10^{9}
19	1.1×10^{9}	6.3×10^{8}	3.0×10^{9}	3.9×10^{9}	4.4×10^{11}	4.7×10^{12}	5.8×10^{9}

ก. กลุ่มทดสอบ : 1 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{4} เซลล์/มล./สายพันธุ์ทุก 3 วันของการเลี้ยง

2 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{5} เซลล์/มล./สายพันธุ์ทุก 3 วันของการเลี้ยง

3= กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{6} เซลล์/มล./สายพันธุ์ทุก 3 วันของการเลี้ยง

4 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{4} เซลล์/มล./สายพันธุ์ทุกวันของการเลี้ยง

5 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{5} เซลล์/มล./สายพันธุ์ทุกวันของการเลี้ยง

6 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{6} เซลล์/มล./สายพันธุ์ทุกวันของการเลี้ยง

กลุ่มควบคุม = กลุ่มไก่ทดสอบที่ไม่ให้กิน *Lactobacillus* spp.

ข. เครื่องหมาย - = ไม่ได้ทดสอบเนื่องจากไก่ที่ใช้มีพ่อ แม่พันธุ์เดียวกันจึงใช้กลุ่มควบคุมเป็นตัวแทนในการทดสอบ

ค. ภาวะการเลี้ยง : อาหารเลี้ยงแบคทีเรียประจำถิ่นใช้ BHI Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37° เซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

ง. ผลของตัวเลขที่แสดงในตาราง เป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทำ 3 ซ้ำต่อการทดลอง

Table 5. Total *Lactobacillus* spp. counts in gastrointestinal tract of chickens

Age (days)	cfu/gm of GI tract Tested group						
	1	2	3	4	5	6	Control
0	-	-	-	-	-	-	<10 estimate
5	6.0×10^{2}	3.9×10^{2}	2.1×10^{3}	5.0×10^{2}	8.2×10^{2}	6.4×10^{4}	<10 estimate
10	1.9×10^{3}	8.6×10^{4}	1.7×10^{4}	7.2×10^{3}	2.9×10^{5}	7.9×10^{6}	<10 estimate
15	7.8×10^{3}	3.5×10^{5}	4.2×10^{6}	9.2×10^{4}	3.2×10^{6}	6.5×10^{8}	<100 estimate
19	2.5×10^{4}	4.7×10^{5}	4.8×10^{7}	6.4×10^{6}	1.6×10^{8}	9.4×10^{9}	4.8×10^{2}

ก.กลุ่มทดสอบ :1 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{4} เซลล์/มล./ สายพันธุ์ ทุก 3 วันของการเลี้ยง

2 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{5} เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วันของการเลี้ยง

3 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{6} เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วันของการเลี้ยง

4 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{4}เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุกวันของการเลี้ยง

5 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{5}เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุกวันของการเลี้ยง

6 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{6} เซลล์/มล./ สายพันธุ์ ทุกวันของการเลี้ยง

กลุ่มควบคุม = กลุ่มไก่ทดสอบที่ไม่ให้กิน *Lactobacillus* spp.

ข. เครื่องหมาย - = ไม่ได้ทดสอบเนื่องจากไก่ที่ใช้มีพ่อ แม่พันธุ์เดียวกันจึงใช้กลุ่มควบคุมเป็นตัวแทนในการทดสอบ

< 10 estimate = ระดับความเจือจาง 1:10 พบโคโลนีของเชื้อน้อยกว่า 30-300 โคโลนี

< 100 estimate = ระดับความเจือจาง 1:10, 1:100 พบโคโลนีของเชื้อน้อยกว่า 30-300 โคโลนี

ค. ภาวะการเลี้ยง : อาหารเลี้ยง *Lactobacillus* spp. ใช้ MRS Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37° เซลเซียส 24-48 ชั่วโมง

ง. ผลของตัวเลขที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทำ 3 ซ้ำต่อการทดลอง

Table 6 Recovery of *Lactobacillus* spp. from GI tract tested group fed with mixed *Lactobacillus* spp.

Age (days)	Tested group					
	1	2	3	4	5	6
1	-	-	-	-	-	-
5	CU. 1,2,4	CU. 1,2,4	CU. 1,2,4	CU. 1,2,4	CU. 1,2,4	CU. 1,2,4
10	CU. 1,2,4	CU. 1,2,4	CU. 1,2,4	CU. 1,2,4,6	CU. 1,2,4,5	CU. 1,2,4,6
15	CU. 1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6
19	CU. 1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6

CU.1 = *Lactobacillus acidophilus*

CU.2 = *Lactobacillus bulgaricus*

CU.3 = *Lactobacillus fermentum*

CU.4 = *Lactobacillus acidophilus*

CU.5 = *Lactobacillus casei* Subsp. *tolerans*

CU.6 = *Lactobacillus jensenii*

ภาวะการเลี้ยง : อาหารเลี้ยง *Lactobacillus* spp. ใช้ MRS Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°เซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แยกโคโลนีบริสุทธิ์และยืนยันชนิดของ *Lactobacillus* spp. โดยติดตามผลการใช้คาร์โบไฮเดรทชนิดต่างๆ

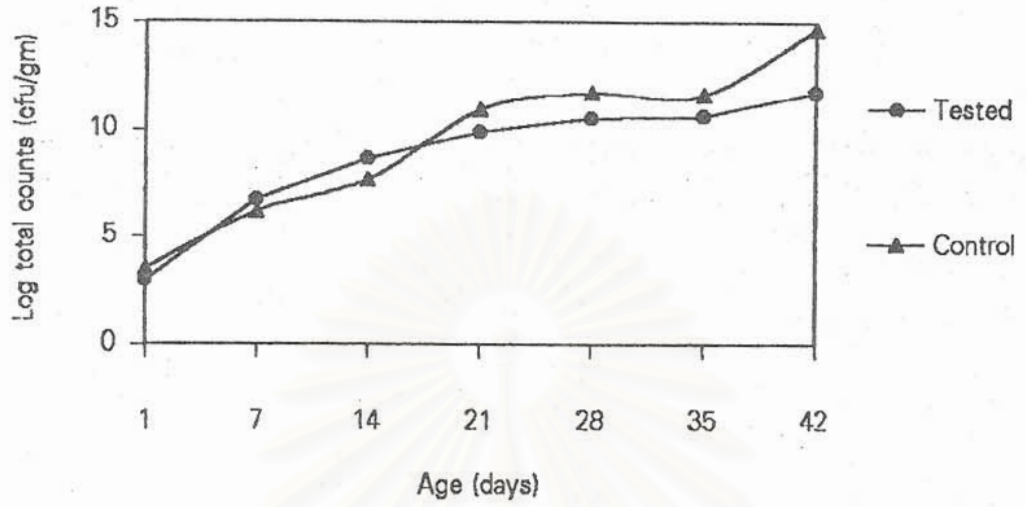
การทดสอบภาคสนามเพื่อดูผลของ *Lactobacillus* spp. แบบผสมต่อการเจริญเติบโตของไก่

จากตารางที่ 5 ทำให้ได้ปริมาณของ *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่จะให้ไก่กิน 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วันของการเลี้ยงเพื่อใช้ในการทดลองต่อมาโดยที่การทดสอบนี้จะใช้ลูกไก่พันธุ์ CB-12-95 CN เพศผู้อายุ 1 วัน ทั้งหมด 128 ตัว ใช้เวลาในการเลี้ยง 42 วัน แบ่งกลุ่มไก่เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม (Control) 1 กลุ่ม จำนวน 64 ตัว และกลุ่มทดสอบ 1 กลุ่ม จำนวน 64 ตัว การทดสอบนี้จะเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในด้านน้ำหนักตัวของไก่ เมื่อสิ้นสุดการทดลองและประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่ทั้ง 2 กลุ่ม โดยจะทำการสุ่มฆ่าไก่ทุกๆ 7 วันของการเลี้ยง เพื่อนำลำไส้ไก่มาตรวจหาจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่น และจำนวน *Lactobacillus* spp. ปรากฏผลดังรูปที่ 1 ดังนี้ คือ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบในวันแรกของการเลี้ยงไก่กลุ่มทดสอบพบจำนวน 9.3×10^2 เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ และกลุ่มควบคุมพบแบคทีเรียประจำถิ่นจำนวนพอๆกันคือ 3.4×10^3 เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ ตรวจไม่พบ *Lactobacillus* spp. ในกลุ่มไก่ทั้ง 2 กลุ่มเมื่ออายุ 1 วัน ซึ่งสอดคล้องกับตารางที่ 4 และตารางที่ 5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

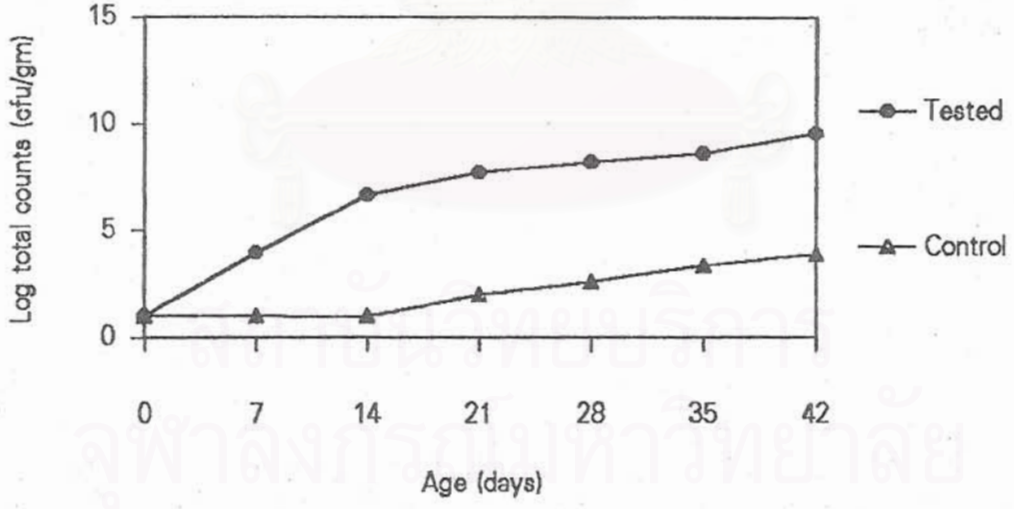
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

a: Bacterial flora



BHI agar was used and incubated at 37°C for 24 hrs.

b: *Lactobacillus* spp.



MRS agar was used and incubated at 37°C for 24 hrs.Tested group (64 chickens) were forcely fed of mixed culture of *Lactobacillus* spp. every 3 days until the age of 42 days. No *Lactobacillus* spp. fed in control group (64 chickens).

Figure 1. Total count from GI tract of chickens by spread plate technique

Table 7. Efficiency of food consumption in chickens

Information	Tested groups	Control
No. of chicken	64.00	64.00
Dead chickens	5.00	3.00
% of death	7.81	4.68
Average weight 3 weeks (gm)	793.61*	784.65*
Average weight increased in 6 weeks (gm)	1822.80*	1759.90*
Growth rate per day (gm)	43.40	41.90
Efficiency of food consumption a period of age 1-19 days	0.892**	0.802**
Efficiency of food consumption a period of age 20-42 days	1.562**	1.565**

กลุ่มทดสอบ = กลุ่มไก่ที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสม ปริมาณ 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ทุก 3 วันของการเลี้ยง

กลุ่มควบคุม = กลุ่มไก่ที่ไม่ให้กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสม

* = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

** = ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การทดสอบผลของ *Lactobacillus* spp. แบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ *Salmonella typhimurium* ในไก่

ใช้ลูกไก่พันธุ์ CB-12-95 CN เพศผู้อายุ 1 วัน จำนวนทั้งหมด 256 ตัว ใช้เวลาในการเลี้ยง 25 วัน โดยแบ่งกลุ่มทดสอบเป็น 8 กลุ่มๆละ 32 ตัวดังนี้คือ

กลุ่มทดสอบควบคุม = กลุ่มทดสอบที่ไม่ให้กินเชื้อ *Lactobacillus* spp. แบบผสม และ *Salmonella typhimurium*

กลุ่มทดสอบโพรไบโอติก(P) = กลุ่มทดสอบที่ให้กินเชื้อ *Lactobacillus* spp. แบบผสม จำนวน 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วัน

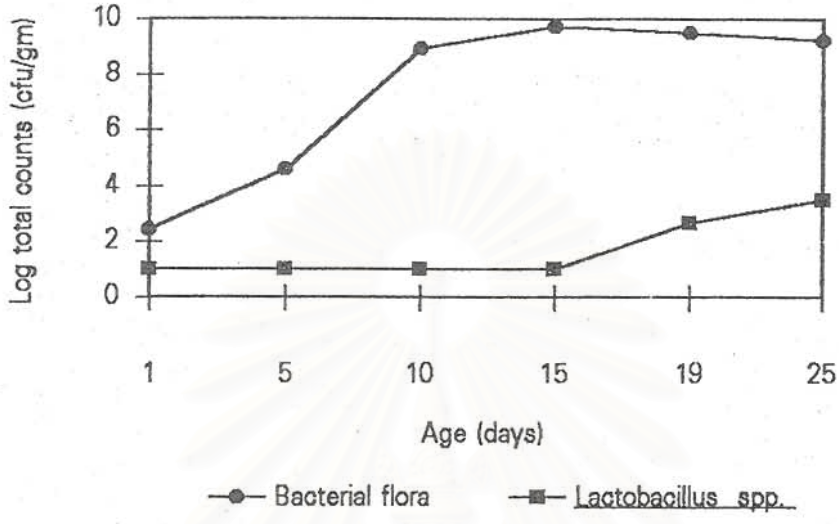
กลุ่มทดสอบ S/H_2O = กลุ่มทดสอบที่ให้กินเชื้อ *Salmonella typhimurium* จำนวน 10^3 เซลล์/มล.ในวันแรกของการเลี้ยงไก่

กลุ่มทดสอบ P_0/S = กลุ่มทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. จำนวน 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ และให้กิน *Salmonella typhimurium* จำนวน 10^3 เซลล์/มล. พร้อมๆกันในวันแรกของการเลี้ยงไก่

เมื่อสุ่มไก่มาฆ่าทุก 5 วันของการเลี้ยงนำลำไส้ไก่มาตรวจสอบหาจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่น, *Lactobacillus* spp. และ *Salmonella typhimurium* ปรากฏผลดังรูปที่ 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

a: Control



b: Fed with Probiotics

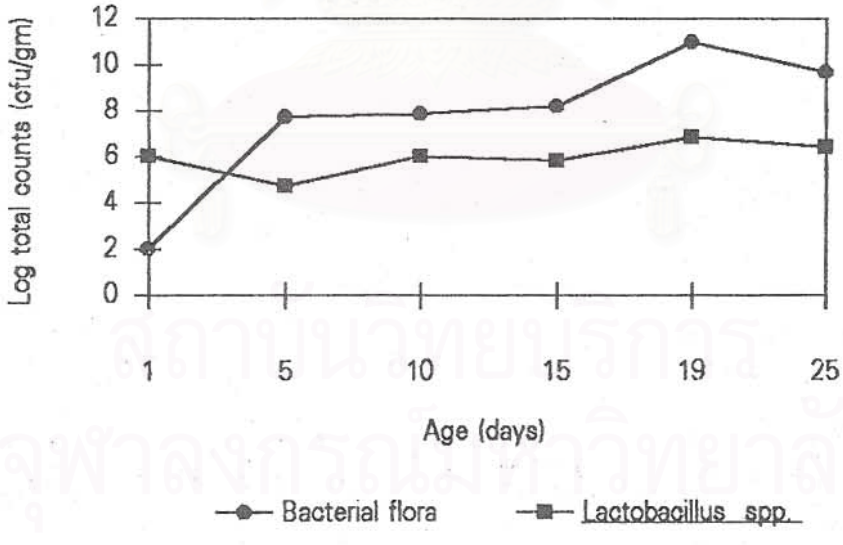
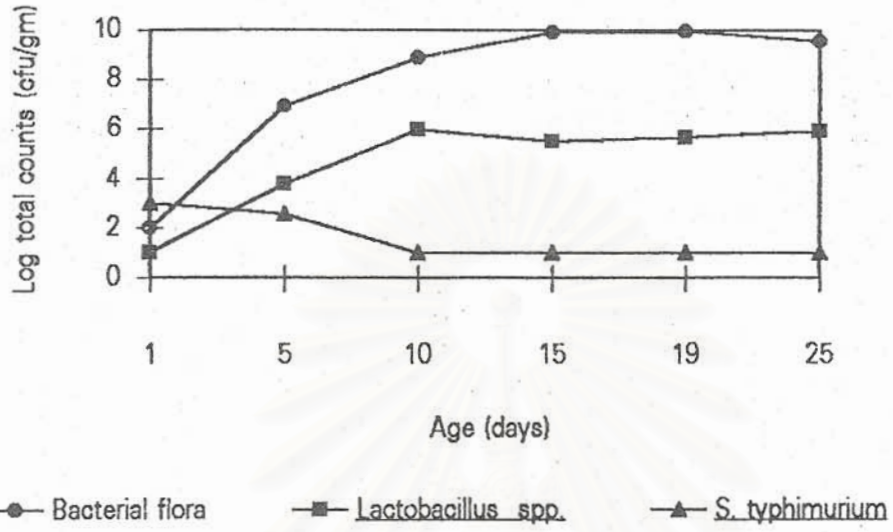


Figure 2. Total viable cell count of Bacterial flora, *Lactobacillus* spp. and *Salmonella typhimurium* from GI tract of chickens.

c: Tested group fed with *Lactobacillus* spp. challenged by *Salmonella typhmurium*



d: Challenged by *Salmonella typhimurium*

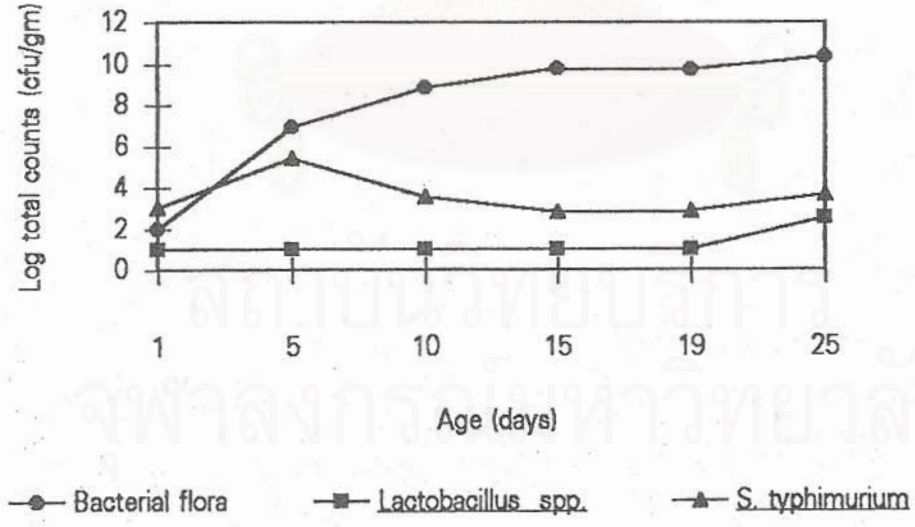


Figure 2 (continued). Total viable cell count of Bacterial flora, *Lactobacillus* spp. and *Salmonella typhimurium* from GI tract of chickens.

จาก Figure 2c แสดงให้เห็นการเจริญของ *Lactobacillus* spp. (P) ในแบบเข้าแทนที่ *Salmonella typhimurium* (Competition Exclusion) ในลำไส้ไก่ตั้งแต่หลังวันที่ 5 ของการเจริญ ในทางตรงกันข้าม *Salmonella typhimurium* ก็สามารถระงับการเจริญของ *Lactobacillus* spp. ที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นของไก่มากกว่า 20 วัน ของการเจริญเติบโตของไก่ (Figure 2d) ผลการทดลองนี้เป็นหลักฐานยืนยันได้ว่า *Lactobacillus* spp. (P) ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกสามารถเจริญได้ในลำไส้ของไก่ และสามารถกำจัด *Salmonella typhimurium* ที่ก่อโรคทางเดินอาหารได้ด้วย ดังนั้นมีความเป็นไปได้ในการใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงสัตว์อุตสาหกรรมเพื่อลดการใช้สารปฏิชีวนะที่นำไปสู่การดื้อยาในผู้บริโภคได้

การเก็บรักษาจุลินทรีย์

ตารางที่ 8 แสดงให้เห็น Viability ของ *Lactobacillus* spp. ที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถเก็บได้ที่ -20°C ในสภาพผงที่เตรียมจากการทำระเหิดแบบแช่แข็ง (lyophilized) เป็นเวลา 1 ปี โดย Viability มีมากกว่า 93% ในทุกสายพันธุ์

Table 8. % Log viability of freeze-dried Lactobacillus spp. (P) culture after storage at -20°C

Freeze-dried culture	% Log Viability (months)				
	0	3	6	9	12
L. acidophilus (CU.1)	100	99.32	98.11	98.66	96.54
L. bulgaricus (CU.2)	100	99.43	99.11	98.77	98.08
L. fermentum (CU.3)	100	98.48	97.43	97.19	93.19
L. casei subsp. *toleranec* (CU.5)	100	99.41	99.31	99.7	98.18
L. jensennii (CU.6)	100	98.91	98.71	98.49	97.66

Lactobacillus spp. ที่คัดแยกทำบริสุทธิ์จากงานวิจัยนี้ มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกเพื่อเสริมในอาหารไก่ไทยได้ดี เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่แยกมาจากเชื้อประจำถิ่นของไก่ไทย เป็นที่น่าสังเกตุว่า *Lactobacillus* spp. บางชนิดเท่านั้นที่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนในลำไส้ไก่ การให้ Probiotics จะเป็นการเพิ่ม *Lactobacillus* spp. ในลำไส้ให้คงอยู่ในปริมาณเพิ่มขึ้นต่อเวลาได้ดีกว่าสายพันธุ์ *Lactobacillus* spp. ที่เจริญเพิ่มเองตามธรรมชาติ Figure 1(b) จึงเป็นการยืนยันได้ว่าส่วนเสริมของ Probiotics ทำให้เพิ่มปริมาณ *Lactobacillus* ในลำไส้ได้ ในไก่กลุ่มทดสอบที่ได้รับ Probiotics แสดงผลการเจริญเติบโตต่อวัน (นน.เป็นกรัม) อย่างมีนัยสำคัญและประสิทธิภาพมากกว่ากลุ่มควบคุม (Table 7) ทั้งนี้เหตุผลก็คือ Probiotics อาจมีส่วนช่วยให้การดูดซึมอาหารได้ดีทำให้อัตราการแลกเนื้อสูงขึ้น

ในการทดสอบการชักนำการเกิดโรคจาก *S. typhimurium* ผลที่ได้แสดงความชัดเจนของการเข้าแทนที่ *S. typhimurium* ด้วย Probiotics ที่เสริมลงในกลุ่มทดสอบ (Figure 2c) และหลัง 19 วัน ไก่ในกลุ่มที่ให้ Probiotics แข็งแรงดีมากกว่ากลุ่มที่ได้รับ *S. typhimurium* อย่างชัดเจน การศึกษาครั้งนี้ยืนยันประโยชน์ของการใช้ Probiotics เป็นตัวเสริมในการเลี้ยงสัตว์อุตสาหกรรมให้มีสุขภาพแข็งแรง ต่อต้านการติดโรคและเพิ่มผลผลิต ตลอดจนลดการใช้สารปฏิชีวนะ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

กองบริการชันสูตรสาธารณสุขภูมิภาค. (ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์). วิธีทำ Sensitivity test (Kirby-Bauer Method). กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. กระทรวงสาธารณสุข. (โรเนียว).

เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2531. คู่มือโรคไก่สำหรับผู้เลี้ยง. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพาณิชย์.

ขจร เจริญศิริ. 2536. แบคทีเรียพื้นฐาน พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์ศิริยอด.

จรัญ จันทลักขณา. 2519. สถิติวิธีวิเคราะห์และวางแผนงานวิจัย กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพาณิชย์.

นภา โล่ห์ทอง. 2522. เอกสารประกอบการบรรยายวิชาจุลชีววิทยาทางอาหาร ภาควิชาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____. 2535. กล้าแบคทีเรีย กล้าเชื้อจุลินทรีย์อาหารหลักและเทคโนโลยีการผลิต. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์ ฟันนี่ พับลิชชิ่ง.

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์. 2524. การผลิตและการเก็บบักเตรีแลคติกที่ใช้เป็นอาหารเสริมสุกรในรูปเชื้อผง.วิทยานิพนธ์ ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มยุรีย์ พันธัย. 2530. จุลชีววิทยาปฏิบัติการและหลักเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์ภาพพิมพ์.

มาลิน จุลศิริ. 2532. ยาต้านจุลชีพความรู้พื้นฐานและประยุกต์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์อักษรบัณฑิต.

มาลินี ลิ้มโภคา และธงชัย อัศวศักดิ์สกุล. 2533. การศึกษายาปฏิชีวนะที่ตกค้างอยู่ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่ใช้เป็นอาหาร. วารสารสัตวแพทย์. 1(2) : 64-69.

วิโรจน์ วนาสิทธชัยวัฒน์. 2522. บทบาทของแบคทีเรียแลคติกต่อวงการเลี้ยงสัตว์. สุกรสาส์น.

_____. นภา โล่ห์ทอง และสุชีพ รัตรสาร. 2522. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกเพื่อเสริมในอาหารสัตว์. ในรายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรและชีววิทยาสาขาสัตว์ครั้งที่ 16. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรพิณ ภูมิภมร. 2524. เอกสารประกอบการสอนวิชา วทอ. 461 ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อาภัสรา กอบกัยกิจ. 2537. การแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตสารต่อต้านจุลชีพจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Aharonowitz, Y. and Demain, A. L. 1979. Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. Can. J. Microbiol 25 : 61-67.

Albus, W.R. 1928. The effect of surface tension upon the growth of *Lactobacilli*. J. Bacteriol. 16 : 167-202.

Banks, J. G. , Broad, R. G., and Sparks, N. H. C. 1986. Natural antimicrobial systems and their potential in food preservation of the future. Biotech. Appl. Biochem. 8 : 103-147.

Barnes, E. M., Impey, C. S. and Cooper, D. M. 1981. Manipulation of the crop and intestinal flora of the newly hatched chick. Am. J. Clin. Nutr. 33: 2426-2433.

Barrow, P. A., Brooker, B. E., Fuller, R. and Newport, M. T. 1980. The attachment of bacteria to the gastric epithelium of pig and its important in the microecology of the intestinal. J. Appl. Bacterial. 48 : 147-154.

Brownell, J. R., Sadler, W. W. and Fanelli, M. J. 1969. Factors influencing the intestinal infectiion of chickens with *Salmonella typhimurium*. Avian Disease. 13 : 804

Brude, A. W., Miller, B. F. and Neil, D. H. 1982. In vivo inhibitory effects of *Lactobacillus acidophilus* against pathogenic *Escherichia Coli* in gnotobiotic chick. Poultry Sci. 61 : 1298-1308.

Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. (eds.) 1974. Bergey's manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Baltimore London: Williams and Wilkins.

Bu'Lock, J. D. 1961. Intermediary metabolism and antibiotic synthesis. Adv. Appl. Microbiol. 3 : 293-342.

Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol. 43 : 164-167.

_____, Mckenny, M. C. and McDonald, L. C. 1990. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. Food Microbiol. 7 : 91-98.

Jay, J. M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. Appl. Environ. Microbiol. 44 : 525-532.

Jensen, H. 1975. Biological effect of feeding pigs with *Lactobacillus acidophilus*. Cited in Dairy Sci. Absts. 37(280) : 2096.

Katz, E. and . Demain, A. L. 1979. The peptide antibiotics of Bacillus Chemistry, biogenesis, and possible functions. Bacterial. Rev. 41(2) : 449-474.

King, J. O. L. 1968. *Lactobacillus acidophilus* as a growth stimulant for pigs. Veternarian. 5 : 273-280.

Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocin production by lactic acid bacteria Biochemie. 70 : 377-349.

Kurylowicz, W. 1976. Antibiotics : A critical Reveiw. Polish Medical Publishers. Warsaw. 1047.

Lioyd, A. B., Cumming , R. B. and Kent, R. D. 1977 Prevention of *Salmonella typhimurium* infection in poultry by pretreatment of chicken and poultry with Intestinal extracts. Austral. vet. J. 53, 82-87.

Liu, W. and Hanson, J. N. 1990. Some chemical and physical properties of Nisin , a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. microbiol. 58 : 2551-2558.

Maralidhara , K. S., Sheggery, G. G., Elliker, P. R., England, D. C. and Sandine, W. E. 1977. Effect of feeding lactobacilli on the coliform and lactobacillus flora of intestinal tissue and feces from piglets. J. Food Prot. 40(5) : 288-295.

Morishita , Y., Mitsuoka, T. , Kancuchi, C. , Yamamoto, S. and Ogata, M. 1971. Specific establishment of lactobacilli in the digestive tract of germ-free chickens. J. of Food prot. 42 : 164-167.

Nikolic, B., Zakula, S., Teofanovic, M. and Blaga, M. 1974. Prevention and treatment of diarrhoea in newborn calves by addition of *Lactobacillus acidophilus* to milk. cited in Dairy Sci. Abst. 36(476) : 4137.

Olson, T. 1969. Intestinal disorder in pigs : Prophylaxis and therapy with *Lactobacillus* cited in Dairy Sci. Abstr. 31(31) : 245.

Parker, R. B. 1974. Probiotics , the other half of the antibiotic story. Anim. Nutr. Health., 29 : 4-8.

Pasienyi, A. 1959. Use of acidophilus skim-milk for pig feeding. cited in Dairy Sci. Abst. 21(414) : 2307.

Pollmann, D. S., Danielson, D. M., Wren, W. B., Peo, Jr. E. R. and Shahani, K. M. 1980. Influence of *Lactobacillus acidophilus* inoculum on gnotobiotic and conventional pigs. J. Anim. Sci. 51 : 629-637.

Premi, L. and Bottazzi, V. 1975. Use of Lactobacilli in the control of intestinal disturbances of pigs. Proc XLX Int. Dairy congr. 1 : 89.

Prescott, S. C. and Buggat. C. G. 1988. Industrial microbiology. 3 nd ed. Tokyo: Kogakushi.

Redmond, H. E. and Moor, R. W. 1966. Biologic effect of introducing *Lactobacillus acidophilus* into a large swine herd experiencing enteristic. Dairy Sci. Abstr. 28 : 2462.

Reiter, B. and Harnulv, B. G. 1984. Lactoperoxidase antimicrobial system : Natural occurrence, biological functions and practical applications. J. Food Prot. 47 : 724.

Rettger, L. F. and Cheplin , H. A. 1921. A Treatise on the transformation of the intestinal flora with special reference to the implantation of *Lactobacillus acidophilus.* Connecticut: Yale university Press , New Haven.

Riis, P. M. and Jakobson, P. E. 1969. The physiology, biochemistry and microbiology of digestion and metabolism of nutrients in pigs. The science of Nutrition of Farm Liverstock. New York : Pergamose Press.

Roger, L. A. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. J. Bacteriol. 16 : 311-316.

Robin, F. vaughan. and Nerad. T. 1982. Lactic acid inhibition of *Salmonella typhinmurium* in yogurt. J. Dairy sci. 65(2) : 197-203.

Schleifer, K. H. 1986. Gram positive cocci. In P.A., Sneath. (ed.) Bergey 's Manual of Systematic Bacterialogy. vol 2. Baltimore London : Williams and Wilkins.

Sandine, W.E. 1979. Roles of lactobacillus in the intestinal tract. J. Food Prot. 42 : 259-262. 1988. New nomencalture of non-rod-shaped lactic acid Bacteria. Bio Chemic. 70 : 519-522.

_____. K.S. Muralidhara ; and D.C. England. 1992. Lactic acid Bacteria in food and health : A review with special reference to enteropathogenic *E. coli* as well as contain enteric diseases and their treatment with antibiotics and lactobacilli. J. Milk Food Technal. 35 : 691-702.

Shirota, M. 1962. Lactobacillus in health and disease. Monograph published in Kyoto, Japan and obtained from the yakult Honsha. Tokyo.

Smith, J.L. and Palumbo, S.A. 1981. Microorganism as food additives. J. Food prot. 44 : 936-937.

Sorrels, K.M. and Speck, M.L. . 1970. Inhibition of *Salmonella gallinarum* by culture filtrates of *Leuconostoc citrovum*. J. Dairy Sci. 53 : 239-240.

Sperber, W.H., and Swan, J. 1976. Hot loop test for the determination of carbon dioxide formation from glucose by Lactic Acid Bacteria. Appl. Environ.Microbiol. 31:990-991.

Stekar, J. 1975. Effect of a supplement of lactic acid bacteria on growth of calves. cited in Nutrition Abstracts and Reveiws. 45 (4) 344 : 2614.

Tagg, J.R., Dajanii , A.S. and Namaker., L.W. 1976. Bacteriocins of gram positive bacteria. Bacteriol . Rev. 40 : 722-756.

Tamine, A.Y. 1981. Microbiology of starter culture, Dairy Microbiology. 2 : 133-156.

Tittsler, R. P. , Pederon , C.S., Snall , E.E., Handlin D. and Niven, C.F. Jr. 1952. Symposium on the lactic acid bacteria. Bact. Rev. 16 : 227-260.

Tortuero, F. 1973. Influence of implantation of *Lactobacillus acidophilus* in chicks on growth, feed conversion, malabsorption of fats and intestinal flora. Poultry Sci. 52(1) : 197-203.

Upreti, G. C. and Hinsdill, R. D. 1973. Isolation and Characterization of a bacteriocin from a homofermentative Lactobacillus. Antimicrob. Agents Chemother. 4 : 489-494.

Waksman, S.A. 1961. The role of antibiotics in nature. Prespect Biol. Med. 4 : 271-278.