จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เงินอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2542

รายงานผลการวิจัย

"เปรียบเทียบการให้โพรไบโอติกในการเลี้ยงไก่"

โดย

ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

8 ตุลาคม 2542

579.37
ศ481ป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เงินอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2542

รายงานผลการวิจัย

"เปรียบเทียบการให้โพรไบโอติกในการเลี้ยงไก่"

โดย

ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

8 ตุลาคม 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19046790 - 8 ม.ค. 2543

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

579.37
ต481ส

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ โดยได้รับความอนุเคราะห์จากคุณพงษ์เทพ เจียรวนนท์ กรรมการรองผู้จัดการใหญ่ฝ่ายวิชาการอาหารสัตว์ บริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ (มหาชน) จำกัด ที่ให้ความกรุณาเอื้อเฟื้อสนับสนุนในด้านสถานที่ทดลองเลี้ยงไก่และจัดหาอุปกรณ์ และขอขอบคุณเงินทุนที่ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2542 ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณปัญชลี ประคองศิลป์ และคุณนิโลบล พรหมประสิทธิ์ ในการช่วยจัดทำรายงานนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

Lactobacillus spp. จำนวน 4 สายพันธุ์ได้แก่ *L.acidophilus* TISTR 1338, *L. bulgaricus* TiSTR 1339, *L. casei* subsp. tolerans TISTR 1341 และ *L. jensenii* TISTR 1342 เก็บในสภาพผงแห้งผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งหลังเก็บไว้เป็นเวลา 12 เดือนที่ –20 ° ซ พบว่าทุกสายพันธุ์มีการรอดชีวิตสูงกว่าร้อยละ 97 เมื่อนำทั้ง 4 สายพันธุ์ผสมในอัตราส่วนเท่ากัน คือ 1:1:1:1 ผสมในอาหารไก่และน้ำดื่มในอัตราส่วน 1:1000 (น้ำหนัก/น้ำหนัก และ น้ำหนัก/ปริมาตร) ด้วยความเข้มข้น 10^6 CFU/g และ CFU/ml พบว่าการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมในน้ำดื่มมีค่าสูงกว่าในอาหารไก่ เมื่อนำมาผสมเพื่อเลี้ยงไก่กระทงเปรียบเทียบระหว่างการให้ในอาหารและการให้ในน้ำดื่มทุก 3 วัน ในปริมาณ 10^6 CFU/g และ CFU/ml ตามลำดับ พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกในน้ำดื่มมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือไก่กลุ่มที่ได้รับสารปฏิชีวนะและเสริมโพรไบโอติกในอาหาร ทั้ง 2 กลุ่มมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมได้รับสารปฏิชีวนะในอาหาร ทดสอบผลต้านทานการติดเชื้อ *S.* Typhimurium ในไก่กระทง ไก่กลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกเสริมในน้ำดื่มสามารถลดการติดเชื้อ *S.* Typhimurium ในลำไส้ได้ดีที่สุดและมีประสิทธิภาพในการลดการติดเชื้อ *S.* Typhimurium สูงกว่าไก่กลุ่มควบคุมได้รับสารปฏิชีวนะ ทำการทดสอบซ้ำในไก่พันธุ์พื้นบ้านไทย ให้ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมในปริมาณและความเข้มข้นเท่าเดิม เมื่อไก่อายุ 10 วัน ให้ *S.* Typhimurium ขนาด 10^8 CFU/ml พบว่าไก่กลุ่มได้รับสารปฏิชีวนะและโพรไบโอติกเสริมในอาหารสามารถลดการติดเชื้อ *S.* Typhimurium ในลำไส้และลดปริมาณ *S.* Typhimurium ในมูลไก่ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ กลุ่มได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและเสริมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม ทั้ง 2 กลุ่มมีประสิทธิภาพในการลดการติดเชื้อ *S.* Typhimurium สูงกว่าไก่กลุ่มควบคุมได้รับสารปฏิชีวนะจากอาหารซึ่งสอดคล้องกับผลของน้ำหนักเฉลี่ย เมื่อครบการเลี้ยงทั้ง 30 วันทั้ง 2 กลุ่มมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม

Abstract

Four strains of *Lactobacillus* spp. including *L.acidophilus* TISTR 1338, *L. bulgaricus* TISTR 1339, *L. casei* subsp. tolerans TISTR 1341 and *L. jensenii* TISTR 1342 selected as probionts in this study were preserved by lyophilization. Their survival were more than 97% after storage for one year at –20 ^{o} C. A 1:1:1:1 ratio of probiotics mixture was added to both chicken diet and drinking water at a concentration of 1 in 1000 (weight/weight and weight/volume) which gave about 10^{6} CFU g^{-1} and 10^{6} CFU ml^{-1} respectively. Survival of *Lactobacillus* spp. mixed in drinking water was higher than those in chicken diet. When feeding broilers with probionts in water and diet every three days, the average highest weight was observed from chicken fed with probiotic-water. After challenged by *Salmonella* Typhimurium the most efficient reduction of this infection in gut were detected in chickens fed with probiotic-water. The results were reproducible when the experiment was repeatedly conducted on Thai local chicken strain. Challenged by S. Typhimurium 10^{8} CFU ml^{-1} after Thai local chicken strain fed with lyophilized-probionts for 10 days showed the most reduction of S. Typhimurium in gut and feces in the group fed with probiotic-regular diet, later in the group with regular diet and probiotic-water. Also, their average weight after 30 days of growth in both treated groups were higher than those of control group with regular diet.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ii

บทคัดย่อภาษาไทย iii

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ iv

สารบัญ v

รายการตารางประกอบ vi

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ viii

บทที่

1. บทนำ 1
2. การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
3. วิธีการวิจัย 16
4. ผลการวิจัย 27
5. การอภิปรายผล 51
6. ข้อสรุป 58
7. ข้อเสนอแนะ 59

ส่วนอ้างอิง 60

ภาคผนวก 67

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลพ
ดท 15
010159
16 ส.ค. 43

รายการตารางประกอบ

ตารางที่ หน้า

1. สมบัติและกลไกการออกฤทธิ์ของโพรไบโอติกและสารปฏิชีวนะ 8
2. log total count และ % viability ของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้ง จำนวน 4 สายพันธุ์เมื่อเก็บรักษาที่ –20 °ซ นาน 12 เดือน 28
3. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Bacillus* spp. และ แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ตรวจพบในอาหารไก่เม็ดสำเร็จรูปของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ มหาชน จำกัด 29
4. เปรียบเทียบการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสม จำนวน 4 สายพันธุ์ ในน้ำกรองที่อุณหภูมิ 21 °ซ และ 30 °ซ 30
5. เปรียบเทียบการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสม จำนวน 4 สายพันธุ์ ในอาหารไก่สำเร็จรูปทั้ง 3 ขนาดที่อุณหภูมิ 21 °ซ และ 30 °ซ 31
6. เปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ย ประสิทธิภาพการใช้อาหารเฉลี่ยและอัตราการตายระหว่างไก่กลุ่มทดลองให้ และไม่ให้โพรไบโอติก เมื่อครบการเลี้ยง 42 วัน 34
7. Total viable count ของแบคทีเรียประจำถิ่นและ *Lactobacillus* spp. ในลำไส้เล็กไก่อายุ 1 – 42 วัน 37
8. สายพันธุ์แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ตรวจพบในลำไส้เล็กไก่อายุ 1, 8 และ 42 วัน 40
9. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด แลคติกแอซิดแบคทีเรียและสายพันธุ์ของแลคติคแอซิดแบคทีเรียในอาหารไก่สำเร็จรูปของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ มหาชน จำกัด 41
10. Total viable count ของแบคทีเรียประจำถิ่นแลคติคแอซิดแบคทีเรียและ *Salmonella* spp. ในลำไส้เล็กไก่พันธุ์เนื้ออายุ 1 –36 วัน 44
11. สายพันธุ์แลคติคแอซิดแบคทีเรียที่ตรวจพบในลำไส้เล็กไก่พันธุ์เนื้ออายุ 1, 18 และ 36 วัน ในการต้านทานการติดเชื้อ *S.* Typhimurium 45
12. เปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ย ประสิทธิภาพการใช้อาหารเฉลี่ยและอัตราการตายของไก่ ระหว่างกลุ่มที่ให้และไม่ให้โพรไบโอติกในการต้านทานการติดเชื้อ *S.* Typhimurium ในไก่พันธุ์เนื้อ 47

รายการตารางประกอบ (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

13. เปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ย ประสิทธิภาพการใช้อาหารเฉลี่ย และอัตราการตาย ของไก่ระหว่างกลุ่มที่ให้และไม่ให้โพรไบโอติกในการทดสอบยืนยันต้านทาน การติดเชื้อ *S.* Typhimurium ในไก่พันธุ์พื้นบ้านไทย 48
14. จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Lactobacillus* spp. และ *S.* Typhimurium ตรวจพบในลำไส้และมูลไก่อายุ 1, 10, 20 และ 30 วันตามลำดับ 49

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

^{o} ซ	=	องศาเซลเซียส
ล.อ.บ.	=	แลคติคแอซิดแบคทีเรีย
มล.	=	มิลลิลิตร
CFU/g	=	โคโลนีต่อกรัม
CFU/ml	=	โคโลนีต่อมิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

อุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เพื่อการส่งออกได้ทวีความสำคัญมากขึ้นทุกปีจนกลายเป็นสินค้าส่งออกที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทยปีละหลายพันล้านบาท โดยไทยเริ่มส่งออกเนื้อไก่ไปยังตลาดต่างประเทศ เมื่อปี พ.ศ. 2516 มีมูลค่า 5,348,500 บาท ในปี พ.ศ. 2539 ไทยส่งออกไก่สดแช่แข็งมีมูลค่า 9,085.00 ล้านบาท จนถึงปี พ.ศ. 2540 ไทยส่งออกมีมูลค่า 10,951.30 ล้านบาท มีมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นจากปี 2539 คิดเป็นร้อยละ 20.5 เป็นประเทศที่ส่งออกไก่สดแช่แข็งมากเป็นอันดับต้น ๆ ของโลก (กรมเศรษฐกิจพาณิชย์, 2541) เพื่อตอบสนองความต้องการของตลาดที่มีเพิ่มมากขึ้นทุกปี จึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตทั้งทางด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ การจัดการเลี้ยงดู และคุณภาพอาหารสัตว์ สารปฏิชีวนะได้ถูกนำมาใช้โดยมีวัตถุประสงค์สำคัญเพื่อใช้เป็นสารเร่งการเจริญโดยนำมาผสมกับอาหารในระดับต่ำ (20-50 ส่วนในล้านส่วน) โดยเฉพาะในสัตว์เล็กสามารถเร่งการเจริญเติบโตให้ดีขึ้นได้ (กองสัตวแพทย์สาธารณสุข, 2537) สาเหตุที่สารปฏิชีวนะสามารถเร่งการเจริญได้ เนื่องจากสามารถออกฤทธิ์กดการเจริญของจุลินทรีย์ในร่างกายสัตว์ ลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ก่อโรคลง รวมทั้งสามารถเพิ่มการดูดซึมสารอาหารในลำไส้ให้ดีขึ้น แต่การที่สัตว์ได้รับสารปฏิชีวนะในระดับต่ำเป็นเวลานานก่อให้เกิดการพัฒนาของเชื้อดื้อยาขึ้นในลำไส้ ถึงแม้ว่าจะมีระยะงดให้แล้วก็ตามแต่ก็ยังคงตรวจพบเชื้อดื้อยาในลำไส้สัตว์ที่ได้รับสารปฏิชีวนะมาก่อน และเชื้อดื้อยาหลายตัวที่พบเป็นจุลินทรีย์กลุ่มก่อโรคในคน จึงอาจเป็นสาเหตุของการแพร่ระบาดของเชื้อดื้อยาขึ้นในคน (Brock และ Madigan, 1991) และในปัจจุบันพบว่ามีการเพิ่มขนาดสารปฏิชีวนะที่ให้เพิ่มขึ้นจนถึงระดับที่ใช้เพื่อป้องกันโรค เป็นสาเหตุให้มีการตรวจพบการตกค้างของสารปฏิชีวนะในเนื้อสัตว์ องค์การอนามัยโลกรายงานว่าการให้สารปฏิชีวนะและยาต้านจุลชีพขนาด 100-200 ส่วนในล้านส่วนจะพบยาที่ให้ในเนื้อสัตว์และยาบางชนิดหรือบางรูปแบบอาจปรากฏออกมาทางน้ำนมหรือไข่ด้วย (มาลิน, 2532) เมื่อผู้บริโภคเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์ก็จะได้รับสารตกค้างเหล่านั้นส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค (อุทัย, 2535) ผู้บริโภคส่วนใหญ่มักไม่ตระหนักถึงปัญหาจากการได้รับสารตกค้างเหล่านี้ เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดอันตรายชนิดรุนแรงในระยะเวลาอันสั้นแต่ในระยะยาวอาจก่อให้เกิดอันตรายได้โดยสารตกค้างหรือเมตาบอไลต์บางตัวเมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วอาจถูกเปลี่ยนไปเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงกว่าสารตั้งต้น รวมทั้งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจุลชีพในร่างกาย ซึ่งทำให้เกิดการขยายตัวของเชื้อดื้อยาขึ้นได้ (ทัศนีย์, 2540)

ปัจจุบันประเทศในกลุ่มยุโรปได้มีประกาศห้ามใช้สารปฏิชีวนะผสมในอาหารสัตว์เพื่อจุดประสงค์เป็นสารเร่งการเจริญเติบโต (Brock และ Madigan, 1991) และเริ่มมีการค้นคว้าหาสารอื่นมาใช้ทดแทนสารปฏิชีวนะ โดยสารนั้นจะต้องมีผลในการเร่งการเจริญเติบโตได้เช่นเดียวกับสารปฏิชีวนะ แต่ต้องไม่มีสารตกค้างที่จะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค การนำจุลินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกนำมาใช้เสริมลงในอาหารสัตว์ เพื่อเสริมสร้างความแข็งแรง และเพิ่มภูมิต้านทานแก่สัตว์ จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีผู้สนใจศึกษากันมาก เนื่องจากเป็นลักษณะของการใช้สิ่งมีชีวิตเข้าควบคุมกันเอง (biological control) และไม่มีผลเสียในเรื่องสารตกค้าง กล่าวคือ จุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นโพรไบโอติกจะต้องมีหลักเกณฑ์ในการคัดเลือกที่เหมาะสม เพื่อให้ประโยชน์สูงสุดในการเร่งการเจริญรวมทั้งไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค โดยจะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรคในคนและสัตว์ ง่ายต่อการเพาะเลี้ยง สามารถทนต่อน้ำย่อย น้ำดี และกรดในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นสมบัติที่ทำให้สามารถมีชีวิตอยู่ในร่างกายสัตว์ได้ รวมทั้งต้องมีความสามารถผลิตสารต่อต้านจุลชีพ ทำให้สามารถป้องกันโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารในสัตวอันจะส่งผลต่อสุขภาพสัตว์ได้ (เพิ่มพงษ์, 2524, Nousiainen และ Setala, 1992) ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับโพรไบโอติกยังได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) ให้เป็นสารที่มีความปลอดภัยในการใช้อีกด้วย (Generally Recognized As Safe, GRAS) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการเสริมสารปฏิชีวนะแล้วพบว่าให้ผลดีกว่าเนื่องจากไม่เกิดการตกค้างของสารที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค จึงเป็นอีกวิธีทางเลือกหนึ่งที่จะนำโพรไบโอติกไปใช้ในอุตสาหกรรมสัตว์และคาดว่าน่าจะนำมาทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะได้ต่อไปในอนาคต

สำหรับการนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมจำเป็นจะต้องพิจารณาหาสายพันธุ์และรูปแบบการนำไปใช้ที่เหมาะสม กล่าวคือ แบคทีเรียยังคงมีแอคติวิตีสูง มีความสะดวกในการนำไปใช้ในฟาร์มได้ งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์นำแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้เป็นโพรไบโอติกเก็บรักษาแบบผงแห้ง (Freeze Dried) และเปรียบเทียบวิธีการให้โพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการเร่งการเจริญเติบโต การต้านทานการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในไก่ นำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับผลการให้สารปฏิชีวนะเสริมในอาหารไก่ เพื่อพิจารณาถึงเหมาะสมในการนำไปใช้ฟาร์มทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะต่อไป

บทที่ 2
การสำรวจความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การใช้สารปฏิชีวนะเสริมในอาหารสัตว์

ตั้งแต่มีการค้นพบเพนนิซิลลินเมื่อปี ค.ศ. 1928 วิวัฒนาการของการผลิตสารปฏิชีวนะก้าวไปอย่างรวดเร็วและพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ปัจจุบันมีสารปฏิชีวนะที่ค้นพบมากกว่า 8,000 ชนิด (Brock และ Madigan, 2540) นอกจากใช้ในการรักษาโรคแล้ว มาลิน (2532) อ้างถึง Moore (1946) พบว่า การใช้สารปฏิชีวนะผสมในอาหารในระดับต่ำสามารถเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ได้ โดยเฉพาะในสัตว์เล็กหรือสัตว์ที่กำลังอยู่ในระยะกำลังเจริญเติบโต ตัวอย่างสัตว์เศรษฐกิจที่ตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะได้ดี ได้แก่ สัตว์ปีกในช่วง 1- 4 สัปดาห์ สุกร 3-6 สัปดาห์ และลูกโคช่วงอายุถึง 3 เดือน นอกจากนี้สัตว์อ่อนแอหรืออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่ดี หรือได้รับอาหารคุณภาพต่ำ จะให้ผลตอบสนองต่อยาได้ดีกว่าสัตว์ปกติที่แข็งแรง (Miller และ Warren, 1976, มาลิน, 2532) การยอมรับนำสารปฏิชีวนะใช้เป็นสารมาตรฐานที่จำเป็นต้องเสริมลงในอาหารไก่กระทงและไก่งวงเกิดขึ้นในปี ค.ศ. 1951 Bird (1969) อ้างถึง Stokstad และ Jukes (1950) ว่าการเสริมออริโอมัยซินในอาหารไก่กระทงช่วยทำให้ไก่กระทงมีน้ำหนักเพิ่มมากขึ้นกว่าพวกไม่เสริมถึงร้อยละ 10-14 ชนิดของสารปฏิชีวนะที่นิยมใช้เสริมในสูตรอาหารไก่และสุกร ได้แก่ แบคซิตราซิน คลอเตตราซัยคลิน ออกซีเตตราซัยคลิน เพนนิซิลลิน สเตรปโตมัยซิน โอลินโดมัยซิน ไทโลซิน และ เวอจิเนียมัยซิน (อุทัย, 2529) ประมาณร้อยละ 58 ของสารปฏิชีวนะที่ผลิตได้ในปัจจุบันแยกได้จาก *Streptomyces* ประมาณร้อยละ 18 แยกได้จาก *Aspergillus* และประมาณร้อยละ 9 แยกได้จาก *Bacillus* สารปฏิชีวนะส่วนน้อยที่เหลือได้แยกจากแบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ เช่น *Norcardia* และ *Micromonospora* นอกจากนี้ยังมีสารปฏิชีวนะที่แยกได้จากพืชชั้นสูงซึ่งมีประมาณร้อยละ 12 และแยกได้จาก algae หรือ lichen และจากสัตว์อื่น ๆ อีกประมาณร้อยละ 3 (มาลินี, 2540)

การให้อาหารไก่เนื้อ

จุดมุ่งหมายการให้อาหารไก่เนื้อ คือ เพื่อให้ไก่เนื้อเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วที่สุดและปราศจากโรคโดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงสั้นที่สุดและใช้อาหารอย่างประหยัดที่สุด กล่าวคือ ให้อาหารน้อยเพื่อเปลี่ยนเป็นเนื้อไก่ให้ได้มากที่สุด ในขณะเดียวกันก็ต้องเป็นอาหารที่มีคุณภาพสูง

ช่วยให้ไก่โตเร็ว ขนงอกเร็ว และแข็งแรง เพื่อให้ได้เป้าหมายของการเลี้ยงไก่ ยาและสารปฏิชีวนะได้ถูกนำมาใช้เพื่อจุดประสงค์ในการเร่งการเจริญเติบโต การเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารและป้องกันโรค โดยการนำมาใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตจะใช้ในระดับต่ำ นิยมผสมลงในอาหารสัตว์โดยตรง (กองสัตวแพทย์สาธารณสุข, 2537) โดยทั่วไปการให้อาหารไก่เนื้อจะแบ่งเป็นระยะตามความต้องการโปรตีนและพลังงาน มีการเสริมไวตะมินและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและเสริมสร้างสุขภาพให้แข็งแรง ทนต่อโรค ผ่านขั้นตอนการผลิตอาหารจนได้เม็ดอาหารขนาดต่าง ๆ พอเหมาะกับระยะการเจริญและขนาดของไก่ มักจะแบ่งเป็น 2 หรือ 3 ระยะ ตามแต่สูตรของแต่ละบริษัท โดยแบ่งตามช่วงการเจริญและน้ำหนักตัว

อาหารไก่ในระยะแรกให้ไก่ในช่วงแรกเกิดถึง 3 หรือ 4 สัปดาห์ จะมีปริมาณโปรตีนที่เสริมให้สูงที่สุดประมาณร้อยละ 22 มีระดับพลังงานที่เสริมในอาหารค่อนข้างต่ำกว่าในระยะอื่น ประมาณ 3,000 กิโลแคลอรีต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ทั้งนี้เนื่องจากไก่ในระยะนี้เป็นช่วงที่มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วมีความต้องการใช้โปรตีนและกรดอะมิโนในการเสริมสร้างกล้ามเนื้อและกระบวนการเมตาบอลิสมต่าง ๆ ในร่างกาย

อาหารในระยะต่อมาให้ไก่ในช่วง 3- 5 สัปดาห์ หรือ 5-8 สัปดาห์ จะมีปริมาณโปรตีนลดลงเหลือประมาณร้อยละ 20 แต่มีปริมาณพลังงานมากขึ้นประมาณ 3,100-3,300 กิโลแคลอรี ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเป็นการเพิ่มน้ำหนักตัวและปริมาณไขมันให้ไก่

อาหารในระยะสุดท้ายให้ไก่ในช่วง 5 สัปดาห์ถึงส่งตลาด อาหารที่ใช้จะเป็นอาหารที่ให้พลังงานสูงขึ้นและมีปริมาณโปรตีนต่ำลงประมาณร้อยละ 18

การเสริมสารปฏิชีวนะลงในอาหารไก่ส่วนใหญ่นิยมเสริมในช่วง 2 ระยะแรกเนื่องจากเป็นช่วงที่ไก่กำลังเจริญเติบโต การให้สารปฏิชีวนะจะมีผลช่วยเร่งการเจริญได้ดี และช่วยเพิ่มค่าประสิทธิภาพการใช้อาหาร โดยเฉพาะเมื่อไก่อยู่ในสภาพเครียด สำหรับอาหารในระยะสุดท้ายจะไม่มีการเติมสารปฏิชีวนะหรือยาซัลฟ่าแต่ในทางปฏิบัติจริงนิยมใช้อาหารในระยะที่สองเลี้ยงต่อไปจนครบอายุส่งตลาด และในบางบริษัทไม่มีการผลิตอาหารในระยะที่ 3 ส่งผลให้ไม่มีระยะงดให้ก่อนส่งโรงฆ่าสัตว์เป็นผลให้เกิดการตกค้างของสารปฏิชีวนะในเนื้อไก่ (กองสัตวแพทย์สาธารณสุข, 2537, ลิขิต, 2532, จารุรัตน์, 2528)

กลไกที่สารปฏิชีวนะสามารถเร่งการเจริญเติบโตได้

กลไกการกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์โดยสารปฏิชีวนะและยาต้านจุลชีพมีหลายทฤษฎีด้วยกัน กล่าวคือ สารปฏิชีวนะที่สัตว์ได้รับทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของจุลชีพในระบบ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทางเดินอาหาร มีผลยับยั้งการเจริญของจุลชีพกลุ่มก่อโรคในลำไส้ เช่น *E. coli* หรือ Salmonella ลดอาการอักเสบของผนังลำไส้ โดยมีผลให้ผนังลำไส้บางลงช่วยให้การดูดซึมสารอาหารของสัตว์ดีขึ้น (Brock และ Madigan, 1991) มีผลต่อกระบวนการ Peristalsis โดยทำให้การเคลื่อนตัวของลำไส้ลดลงเพราะถ้า Peristalsis เกิดมากจะทำให้การเก็บกักอาหารในทางเดินอาหารน้อย ถ้า Peristalsis ลดลงอาหารจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้มากขึ้นส่งผลให้การเจริญเติบโตดีขึ้น และทำให้ผนังลำไส้อุ้มน้ำได้มากขึ้น เช่น คลอเตตราซัยคลิน หรือ ซาลิโนมัยซิน จะทำให้มีการดูดซึมน้ำในช่วงลำไส้ใหญ่กลับสู่ร่างกายมากขึ้น และดูดซึมไขมันกลับเข้าร่างกายมากขึ้น (ยุคล, 2533) รวมทั้งมีผลลดการสร้างทอกซินของจุลชีพโดยเฉพาะอย่างยิ่งทอกซินที่มีผลชะลอการเจริญเติบโตของร่างกาย (ทัศนีย์, 2540) กระตุ้นให้มีการสร้างไวตะมินบี 12 และไวตะมินซี เพิ่มมากขึ้น (Tortora, Funke และ Case, 1986) อย่างไรก็ตามทฤษฎีดังกล่าวยังคงเป็นแค่ข้อเสนอแนะเท่านั้น เนื่องจากยังไม่ข้อมูลพิสูจน์ได้อย่างชัดเจน

ปัญหาที่เกิดจากการใช้สารปฏิชีวนะและสารต้านจุลชีพในอาหารสัตว์ มีดังนี้

ผลเสียที่เกิดจากการใช้สารปฏิชีวนะเสริมในอาหารสัตว์เป็นระยะเวลานานโดยไม่มีระยะงดให้รวมทั้งมีการใช้ยาอย่างพร่ำเพรื่อไม่มีการควบคุมปริมาณและชนิดของให้เหมาะกับการรักษาโรคส่งผลต่อทั้งในสัตว์ที่ได้รับสารปฏิชีวนะโดยตรงและส่งผลต่อผู้บริโภค กล่าวคือ ในสัตว์การที่ได้รับสารปฏิชีวนะในระยะเวลานานติดต่อกันส่งผลให้จุลินทรีย์เกิดการดื้อยา ปริมาณแบคทีเรียที่ดื้อยานี้จะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้การใช้สารปฏิชีวนะในระดับรักษาโรคไม่ได้ผลเท่าที่ควร ส่งผลให้เกิดการแพร่ระบาดของจุลินทรีย์กลุ่มก่อโรคได้มากขึ้น (มาลิน, 2532) โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบ ได้แก่ Salmonella ตรวจพบมียีนดื้อยาอยู่ที่พลาสมิดและสามารถถ่ายทอดสมบัติดื้อยานี้ให้แก่แบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบอื่นๆได้ ส่งผลให้แบคทีเรียกลุ่มแกรมลบก่อโรคในลำไส้สัตว์แพร่ระบาดมากขึ้น สมบัติการดื้อยานี้สามารถถ่ายทอดให้แก่แบคทีเรียกลุ่มก่อโรคในคนได้เช่นกัน (Brock และ Madigan, 1991) ส่งผลให้เกิดการขยายตัวของแบคทีเรียก่อโรคมากขึ้น และการรักษาโรคในคนโดยใช้สารปฏิชีวนะมีความลำบากมากขึ้น (มาลิน, 2525) นอกจากนั้นในกรณีที่มีการให้สารปฏิชีวนะติดต่อกันเป็นระยะเวลานานโดยไม่มีระยองดให้ อาจก่อให้เกิดปัญหาสารตกค้างในเนื้อสัตว์ได้ ผู้บริโภคที่ได้รับสารตกค้างเหล่านี้อาจเกิดอันตรายต่อสุขภาพได้ แต่โดยทั่วไปปริมาณยาที่ตกค้างในเนื้อสัตว์ หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์มักไม่สูงพอที่จะทำให้เกิดอันตรายชนิดรุนแรงได้ แต่ปัญหาสำคัญคืออันตรายที่เกิดในระยะยาวซึ่งก็ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของยาที่ตกค้าง นอกจากนี้ยาบางตัวเมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วอาจถูกเปลี่ยนไปเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงกว่า

สารตั้งต้นหรือเป็นสารก่อมะเร็ง นอกจากนี้อันตรายที่เกิดจากยาตกค้างทางอ้อมก็พบได้ในผู้บริโภค เช่น ทำให้เกิดอาการของโรคภูมิแพ้ หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงของจุลชีพในร่างกาย ซึ่งก่อให้เกิดโรค หรือทำให้เกิดการขยายตัวของเชื้อยาได้ (ทัศนีย์, 2540)

การใช้โพรไบโอติกเสริมในการเลี้ยงสัตว์

จากปัญหาเชื้อดื้อยาและการตกค้างของสารปฏิชีวนะดังกล่าวข้างต้นจึงได้มีผู้สนใจศึกษานำโพรไบโอติกมาใช้เสริมในการเลี้ยงสัตว์ โพรไบโอติกนำมาใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ.1907 โดย Metchnikoff แต่ความสนใจในการนำมาใช้เสริมในการเลี้ยงสัตว์ (feed supplement) เกิดขึ้นอย่างจริงจังในปี ค.ศ. 1974 (Fuller, 1992)

ได้มีผู้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกไว้ดังนี้ คือ

Fuller (1989) กล่าวว่า โพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ใช้เสริมในการเลี้ยงสัตว์โดยมีผลปรับความสมดุลย์ของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร

Havenaar และ Huis in't Veld (1992) กล่าวว่า โพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตหนึ่งชนิดหรือมากกว่าในรูปผสมของหลายสายพันธุ์เสริมให้คนและสัตว์ ให้ประโยชน์ต่อผู้อาศัย โดยมีผลปรับปรุงให้เกิดสมดุลย์ของแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหาร รวมทั้งหมายถึงรูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เช่น เซลล์ในรูปผงแห้ง (Lyophilized form) หรือผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการหมัก (fermented product) มีผลช่วยปรับปรุงสุขภาพคนและสัตว์ มีผลต่อระบบทางเดินอาหาร(ใช้เสริมในรูปอาหารหรือแคบซูล)

การนำโพรไบโอติกใช้ในการเลี้ยงสัตว์อาจใช้ในรูปสายพันธุ์เดี่ยว หรือสายพันธุ์ผสม (mixed culture) ของหลาย ๆ สายพันธุ์ โดยใช้ในรูปผงหรือแคปซูล แกรนูล หรือในรูปเซลล์เปียกโดยป้อนให้สัตว์ทางปากโดยตรง หรือผสมลงในอาหาร และในน้ำดื่ม รวมทั้งในปัจจุบันนำมาใช้ในรูปสเปรย์พ่นรอบพื้นที่โรงเรือนเพื่อปรับสภาพแวดล้อมของจุลินทรีย์ในโรงเรือน (Fuller, 1992)

หลักเกณฑ์การคัดเลือกจุลินทรีย์ใช้เป็นโพรไบโอติก (Gilliland, 1979, Fuller, 1989, Nousiainen and Setala, 1992) **มีดังนี้**

1. เป็นจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ก่อโรค โดยเป็นสายพันธุ์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์เจ้าบ้าน (host) สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง เช่น ในกระเพาะอาหาร และสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นสูง เนื่องจากบริเวณลำไส้เล็กเป็นบริเวณที่มีการหลั่งของน้ำดีจากตับอ่อน

2. สามารถเจริญเพิ่มจำนวนและมีเมตาบอลิสมในระบบทางเดินอาหารได้

3. สามารถแข่งขันเข้ายึดเกาะกับจุลินทรีย์ก่อโรคในบริเวณเยื่อบุระบบทางเดินอาหารได้

4. ผลิตกรดอินทรีย์และสารต่อต้านจุลชีพซึ่งมีผลลดจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคลง

5. เพาะเลี้ยงได้ง่าย เจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และมีอัตราการรอดชีวิตสูงเมื่อเก็บรักษาในระยะเวลานาน

6. ในกรณีที่ใช้ร่วมกับสารปฏิชีวนะเพื่อให้ได้ผลผลิตที่ดียิ่งขึ้น ควรมีสมบัติทนต่อสารปฏิชีวนะที่ผสมในอาหารสัตว์ด้วย

จุลินทรีย์ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติก (Fuller, 1992)

1. *Lactobacillus* spp.
2. *Streptococcus* spp.
3. *Leuconostoc* spp.
4. *Pediococcus* spp.
5. *Propionibacterium* spp.
6. *Enterococcus* spp.
7. *Bifidobacterium* spp.
8. *Bacillus* spp.
9. Yeasts (*Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida pintolopesii*)
10. Moulds (*Aspergillus niger* และ *A. oryzae*)

จากจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกดังกล่าวข้างต้น แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นกลุ่มแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่มักใช้เสริมในการเลี้ยงสัตว์ เนื่องจากมีคุณสมบัติครบตามหลักเกณฑ์ของโพรไบโอติกที่ดี ได้แก่ เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ก่อโรค พบเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารคนและสัตว์ สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ดี และมีเมตาบอลิสมในร่างกายผู้อาศัย สามารถทนกรดและเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงจึงสามารถเจริญอยู่ในระบบทางเดินอาหารและลำไส้สัตว์ได้ สร้างกรดอินทรีย์และสารต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในลำไส้ได้ เพิ่มจำนวนและเพาะเลี้ยงได้ง่ายที่อุณหภูมิห้อง รวมทั้งทนต่อสารปฏิชีวนะที่เสริมในอาหารสัตว์ได้โดยสามารถแยกสายพันธุ์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ทนสารปฏิชีวนะได้จากสุกร ไก่ และโค ที่ได้รับสารปฏิชีวนะ (Nousiainen และ Setala, 1992)

Parker (1974) และ Fuller (1989) ได้รวบรวมและเปรียบเทียบสมบัติและกลไกการออกฤทธิ์ของโพรไบโอติกและสารปฏิชีวนะไว้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สมบัติและกลไกการออกฤทธิ์ของโพรไบโอติกและสารปฏิชีวนะ

โพรไบโอติก	สารปฏิชีวนะ
1. เป็นสิ่งมีชีวิต	1. เป็นสารเคมีบริสุทธิ์
2. ไม่ดูดซึมในทางเดินอาหาร	2. ดูดซึมได้ในทางเดินอาหาร
3. เพิ่มการเจริญและประสิทธิภาพการใช้อาหาร	3. เพิ่มการเจริญและประสิทธิภาพการใช้อาหาร
4. ไม่มีการหลงเหลือในเนื้อเยื่อ	4. มีการหลงเหลือในเนื้อเยื่อ
5. ไม่ก่อให้เกิดเชื้อกลายพันธุ์หรือดื้อยา	5. ทำให้เชื้ออื่นเกิดการกลายพันธุ์หรือดื้อยา
กลไกการออกฤทธิ์	**กลไกการออกฤทธิ์**
1. ให้กรดเพิ่มสภาวะการเป็นกรดและยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค	1. ขัดขวางการสังเคราะห์ผนังเซลล์, DNA, RNA หรือโปรตีน
2. ให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อเฉพาะที่	2. ให้ฤทธิ์ต้านเชื้อได้ทั้งร่างกายและออกฤทธิ์ต่อเชื้อต่าง ๆ ได้มากชนิด
3. เจริญได้ในทางเดินอาหารและแข่งการเจริญกับเชื้อก่อโรคได้	

ที่มา : Parker (1974) และ Fuller (1989)

การใช้โพรไบโอติกเสริมในการเลี้ยงไก่

Tortuero (1973) ทดลองเสริม *L. acidophilus* ในรูปผงแห้ง (freeze- dried culture) ความเข้มข้น 10^9 CFU/g ลงในน้ำดื่มความเข้มข้นสุดท้าย 10^6 CFU/ml เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารปฏิชีวนะจากอาหาร กลุ่มที่ได้รับ *L. acidophilus* ผสมในน้ำดื่มและได้รับสารปฏิชีวนะจากอาหาร และกลุ่มควบคุมไม่ได้รับสารปฏิชีวนะและ *L. acidophilus* จากอาหาร พบว่าในทั้ง 2 กลุ่มทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มต่อวันสูงกว่าไก่กลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัด โดยใน

แต่ละกลุ่มทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มใกล้เคียงกัน และเมื่ออายุ 9 วัน ในกลุ่มได้รับ *L. acidophilus* พบว่า *L .acidophilus* เข้าไปเจริญและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียประจำถิ่น โดย Enterococcus ที่ตรวจพบในช่วงแรกของการเจริญถูกแทนที่ด้วย *L. acidophilus*

Couch (1978) พบว่าไก่กระทงสามารถตอบสนองต่อโพรไบโอติกได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด เช่น ในสภาวะที่มีอากาศแปรปรวน หรืออุณหภูมิต่ำกว่าปกติ โดยทดลองเสริม *L. acidophilus* ลงในอาหารไก่ในปริมาณ 0.025, 0.0375, 0.05, 0.0625 และ 0.075% ตามลำดับ พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการเจริญในไก่กลุ่มได้รับโพรไบโอติกในเพศผู้ 7-10% และเพศเมีย 5-6% ตามลำดับ ทดลองซ้ำครั้งที่ 2 เลี้ยงไก่กระทงโดยควบคุมให้อุณหภูมิเหมาะสมและคงที่ตลอดการทดลอง โดยเสริมโพรไบโอติกในอาหารสูตรที่มีกรดอะมิโนในระดับต่ำในปริมาณ 0.05, 0.1 และ 0.2% ตามลำดับ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า ไก่กลุ่มได้รับโพรไบโอติกสามารถเร่งอัตราการเจริญได้ดีกว่าไก่กลุ่มควบคุมไม่ได้รับโพรไบโอติก

Arens (1981) ทดลองเสริม *L. acidophilus* ในน้ำดื่ม โดยใช้สายพันธุ์ทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นสูง โดยไก่ยังคงได้รับสารปฏิชีวนะจากอาหารตามปกติ ทำการทดลองเลี้ยงในระดับฟาร์ม ชุดแรกไก่กลุ่มทดลองได้รับ *L. acidophilus* ในน้ำดื่มในปริมาณ 10^{8} CFU/ml ทุกวัน นาน 30 วัน ผลการทดลอง พบว่าน้ำหนักไก่กลุ่มทดลองเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม 6% และค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารเพิ่มขึ้น 3% ชุดที่ 2 ใช้จำนวนไก่ทดลองเท่ากันทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ใช้สภาวะทดลองเหมือนชุดแรก ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักและประสิทธิภาพการใช้อาหาร พบว่ากลุ่มทดลองมีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม 3% และ 1% ตามลำดับ ชุดที่ 3 ให้ Lactobacilli 6.0×10^{7} CFU/ml ทุกวัน นาน 52 วัน พบว่ามีผลเพิ่มน้ำหนัก 4% และค่าประสิทธิภาพการใช้อาหาร 3% ตามลำดับ และการทดลองในชุดที่ 4 พบว่ามีน้ำหนักเพิ่มเท่ากับ 2% และค่าประสิทธิภาพการใช้อาหาร 3.6% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จึงสรุปได้ว่าการให้ *L. acidophilus* ในน้ำดื่มมีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตได้ดีกว่าการใช้สารปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว

Miles และคณะ (1981) ทดลองเสริม *L. acidophilus* ในอาหารไก่ไข่ในขนาด 0.0125, 0.0375 และ 0.0625% ในพื้นที่ต่างกัน 3 แห่ง คือ ที่รัฐอริโซน่า ฟลอริด้า และ เซาท์ดาโกต้า พบว่าให้ผลแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ โดยมีผลเพิ่มปริมาณการผลิตไข่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่รัฐอริโซน่า แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญที่รัฐฟลอริด้าและไม่มีความแตกต่างที่รัฐเซาท์ดาโกต้า เปรียบเทียบค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารพบว่าที่รัฐอริโซน่าการใช้ Lactobacillus เสริมในระดับต่ำมีผลทำให้ค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม ในพื้นที่อื่นไก่ที่ได้รับ Lactobacillus มีค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารสูง

กว่ากลุ่มควบคุม เปรียบเทียบผลของ Lactobacillus ต่อจำนวน *E. coli* ในระบบทางเดินอาหาร พบว่าที่รัฐฟลอริด้าการเพิ่มขึ้นของ *L. acidophilus* อย่างรวดเร็ว มีผลทำให้จำนวน *E. coli* ในระบบทางเดินอาหารลดลงอย่างเห็นได้ชัด

Watkins, Miller และ Neil (1982) ทดสอบความสามารถของ *L. acidophilus* ในการต้านทานการติดเชื้อ *E. coli* โดยให้ *L. acidophilus* ในรูป broth ความเข้มข้น 10^8 – 10^9 CFU/ml ตั้งแต่อายุ 2 วัน ให้ซ้ำทุก 2 วัน และให้ *E. coli* ความเข้มข้น 10^7 CFU/chick เปรียบเทียบระหว่างการให้เพื่อป้องกันและให้เพื่อรักษา พบว่าการให้เพื่อป้องกันโดยให้ *L. acidophilus* ก่อนไก่ได้รับ *E. coli* 2 วัน มีผลลดอัตราการตายของไก่ได้ดีกว่าการให้เพื่อการรักษา และการให้ *L. acidophilus* ไม่ว่าจะให้ก่อนหรือหลังจากได้รับ *E. coli* มีผลทำให้ pH ในกระเพาะพัก ลำไส้ใหญ่ และไส้ตรงลดลง

Watkins และ Miller (1983) ป้อน *L. acidophilus* ในรูป broth ความเข้มข้น 10^8 CFU/chick ให้ลูกไก่แรกเกิด ทุก 2 วัน โดยดูความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อ *S.* Typhimurium และ *S. aureus* ความเข้มข้น 10^9- 10^{10} CFU/chick เปรียบเทียบการให้ในรูปการป้องกันและรักษาโรค พบว่าการให้เพื่อป้องกันโรค โดยให้ *L. acidophilus* ก่อนการให้เชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิด สามารถลดอัตราการตายในไก่อย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.01$) พร้อมทั้งลดจำนวนเชื้อก่อโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.05$) โดยประสิทธิภาพของ *L. acidophilus* ในการลดจำนวนเชื้อก่อโรคจะเกิดได้ดีที่กระเพาะพัก แต่ได้ผลไม่ดีนักในลำไส้ใหญ่ และไส้ตรง ค่า pH เฉลี่ยของบริเวณผิวหน้าของกระเพาะพัก ลำไส้เล็กส่วนต้น ลำไส้ใหญ่ และไส้ตรงของไก่มีค่าลดลง เรียงตามลำดับได้แก่ 5.43, 5.02, 6.18, 6.56 และ 6.71 ในขณะที่ในส่วนลำไส้เล็กส่วนกลาง และส่วนปลายไม่พบว่า *L. acidophilus* ที่ให้มีผลต่อ pH บริเวณผิวหน้าแต่อย่างใด

Castaldo (1991) อ้างถึงรายงานของ Jiraphocakul และ Sullivan (1990) ทดลองเสริม *Bacillus subtilis* เป็นโพรไบโอติกร่วมกับสารปฏิชีวนะเสริมในอาหารไก่งวง พบว่าเมื่อเสริมโพรไบโอติกและสารปฏิชีวนะต่างชนิดกันให้ผลค่าน้ำหนักเฉลี่ยที่แตกต่างกัน แต่ส่วนใหญ่ไก่กลุ่มได้รับโพรไบโอติกและสารปฏิชีวนะเสริมร่วมกันจะมีประสิทธิภาพการใช้อาหารดีกว่ากลุ่มได้รับสารปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว

Javed , Hameed และ Sildique (1993) ทำการทดสอบยืนยันผลของ Lactobacillus ต่อการต้านทานการติดเชื้อ Salmonella โดยเสริมในรูปสารละลายนมในน้ำดื่ม ให้ทุก 3 วัน จนอายุครบ 15 วัน แบ่งเป็น 3 กลุ่มทดลอง แต่ละกลุ่มได้รับ *S.* Gallinarum, *S.* pullorum และ *S.* Typhimurium ความเข้มข้น 2×10^5 CFU/chicks ผลการตรวจนับพบว่าจำนวน

Salmonella ในกระเพาะพักและลำไส้ใหญ่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมไม่ได้รับโพรไบโอติก

Corrier และคณะ (1995) สกัดแยกส่วนของเหลวในส่วนลำไส้ใหญ่ของไก่พันธุ์เนื้ออายุ 10 สัปดาห์ ได้แบคทีเรียทั้งสิ้น 29 สายพันธุ์ ประกอบด้วย 15 facultative anaerobes และ 14 obligate anaerobes เพาะเลี้ยงในระบบ continuous flow cultures ทดลองโดยการฉีดพ่น CCF Culture ในโรงเรือนที่เลี้ยงไก่อายุ 1 วัน เปรียบเทียบจำนวน Salmonella ที่ตรวจพบในโรงเรือน ในลำไส้อายุ 3 และ 6 สัปดาห์ และใน Skin feather เมื่ออายุ 6 สัปดาห์ ระหว่างกลุ่มได้รับ CCF Culture และกลุ่มควบคุม ผลการทดลองพบว่ามีการปนเปื้อนของ Salmonella เข้ามาในโรงเรือนตั้งแต่วันแรก ๆ ของการเลี้ยงและตรวจพบอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการเลี้ยง ขณะที่ในลำไส้ใหญ่อายุ 3 สัปดาห์ ตรวจพบจำนวน Salmonella ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และเมื่ออายุครบ 6 สัปดาห์ ผลการตรวจ skin feather จำนวน Salmonella ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในชุดซ้ำที่ 1 แต่ในอีก 2 ชุดทดลองผลไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม สรุปได้ว่าการนำแบคทีเรียผสมจากของเหลวสกัดแยกจากลำไส้ใหญ่ไก่โตเต็มวัยใช้ในรูปสเปรย์ฉีดพ่นรอบโรงเรือนสามารถต้านทานการติดเชื้อ Salmonella ได้

Nisbet และคณะ (1995) นำแอนแอโรบิคแบคทีเรียแบบผสมในรูปของเหลวแยกได้จากลำไส้ใหญ่ และอุจจาระไก่โตเต็มวัยและมีสุขภาพดีจำนวน 29 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., *E. coli*, *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., Lactobacillus, Pseudomonas, Propionibacterium, Bifidobacterium, Eubacterium, Veillonella และ Fusobacterium ใช้ในรูปโพรไบโอติกเพื่อควบคุมและยับยั้งการเจริญของ Salmonella ในลำไส้ไก่ ปริมาณที่เหมาะสมในการใช้ คือ 10^8 CFU/ml ผสมในน้ำดื่มในอัตรา 1: 4 (1 ส่วนโพรไบโอติก : 4 ส่วนของน้ำ) ให้น้ำไก่ตั้งแต่แรกเกิดจนครบ 18 ชั่วโมง ประมาณว่าไก่ 1 ตัวได้รับน้ำ 10 มิลลิลิตร จึงเปลี่ยนให้น้ำตามปกติ และให้ *S.* Typhimurium 10^4 CFU/ml เมื่ออายุ 3 วัน ปรากฏว่าไก่กลุ่มได้รับโพรไบโอติกสามารถเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อ Salmonella ได้โดยลดจำนวน Salmonella ในลำไส้ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.005$)

Haddadin และคณะ (1996) ผสม *L. acidophilus* ความเข้มข้นประมาณ 10^6 CFU/ml ในรูป broth เข้ากับอาหารไก่ไข่โดยให้ทุก 3 วัน จนครบอายุ 40 สัปดาห์ ในช่วง 8 สัปดาห์สุดท้ายให้อาหารสูตรปกติ ปรากฏว่าปริมาณไข่ที่ผลิตและประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (8% และ 14.8%) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และปริมาณคลอเลสเตอรอลในไข่แดงลดลงถึง 18.8% โดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับ *L. acidophilus* ขนาด 4.0×10^6 CFU/ml ปริมาณคลอเลสเตอรอลลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมถึง 55% สาเหตุสำคัญพบว่า

ปริมาณ *L. acidophilus* ในกลุ่มทดลองมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมมาก และสูงกว่าความเข้มข้นตั้งต้นที่เติมลงไป แสดงว่า *L. acidophilus* สายพันธุ์ที่ให้สามารถเข้าไปเจริญและเพิ่มจำนวนในลำไส้ได้

Yeo และ Kim (1997) เปรียบเทียบการเสริมสารปฏิชีวนะในอาหาร โพรไบโอติกและ Yucca Extract ซึ่งเป็นของเหลวสกัดจากลำไส้ไก่โตเต็มวัยประกอบด้วยส่วนผสมของจุลินทรีย์หลายชนิดนำมาเลี้ยงไก่กระทง เสริมคลอเตตราซัยคลินในอาหาร 0.1% , *Lactobacillus* casei 0.1% และ Yucca Extract 0.2% ตามลำดับ ไก่กลุ่มได้รับอาหารผสมโพรไบโอติกมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อวันสูงกว่ากลุ่มควบคุมในช่วง 3 สัปดาห์แรกอย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.05$) โดยในช่วง 3 สัปดาห์แรกไก่กลุ่มได้รับโพรไบโอติกในอาหารมีแอคติวิตีของเอนไซม์ยูรีเอสในลำไส้เล็กลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับไก่กลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในลำไส้ใหญ่ แต่เมื่อเลี้ยงครบ 6 สัปดาห์แอคติวิตีของเอนไซม์ยูรีเอสไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จึงกล่าวได้ว่าการเสริมโพรไบโอติกในอาหารไก่สามารถลดแอคติวิตีของเอนไซม์ยูรีเอสในลำไส้เล็กไก่รุ่นได้ และมีประสิทธิภาพช่วยเสริมสร้างให้ไก่มีสุขภาพแข็งแรง และเจริญเติบโตดีกว่าไก่กลุ่มได้รับสารปฏิชีวนะ การลดลงของปริมาณเอนไซม์ยูรีเอสนี้ส่งผลลดการสะสมของปริมาณแอมโมเนียซึ่งเป็นพิษต่อลำไส้ลง มีผลทำให้อัตราการเจริญของไก่ดีขึ้น

ฐิติพงษ์ (2539) ทดลองแยก *Lactobacillus* spp. จำนวน 6 สายพันธุ์จากลำไส้ไก่โตเต็มวัยที่มีสุขภาพแข็งแรง คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบก่อโรคในคนและสัตว์ มีความทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นสูง และทนต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้เสริมในอาหารสัตว์ นำ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 6 สายพันธุ์ที่ได้ผสมในรูปโพรไบโอติกเสริมในการเลี้ยงไก่ โดยเตรียมในรูปสารละลายเซลล์สดใน 0.85% โซเดียมคลอไรด์ ให้ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าไก่กลุ่มทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสมมีน้ำหนักตัวมากกว่าไก่กลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้ให้ *Lactobacillus* spp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) ปริมาณการให้ที่เหมาะสมเท่ากับ 10^{6} CFU/ml และให้ทุก 3 วัน ประสิทธิภาพการใช้อาหารไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทั้ง 2 กลุ่ม และสามารถลดการเป็นพาหะของเชื้อ *S.* Typhimurium ในลำไส้ลงได้

การเก็บรักษาแลคติกแอซิดแบคทีเรียเพื่อใช้ในทางอุตสาหกรรม

สำหรับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมโดยทั่วไปนิยมเก็บรักษาหัวเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย และ Lactobacillus ในรูปทำแห้งมากกว่าเซลล์สด วิธีที่นิยมใช้ คือ การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze Drying) และการทำแห้งแบบผงแห้ง (Spray Drying) (Kets และคณะ, 1996) เนื่องจากสามารถชะลอความชื้นและยืดอายุการเก็บหัวเชื้อและผลิตภัณฑ์ได้นานมากกว่า 1 ปีในสภาพการเก็บที่เย็นและไม่มีแสง และยังคงมีอัตราการรอดชีวิตของหัวเชื้อแบคทีเรีย หรือสปอร์ของราอยู่ในระดับสูงเมื่อเทียบกับวิธีอื่น ๆ (พรเทพ, 2538)

Kim และ Blowmik (1990) ศึกษาอัตราการรอดชีวิตของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในโยเกิร์ตธรรมชาติระหว่างการทำแห้ง พบว่าการทำแห้งด้วยวิธีเยือกแข็งจะมีอัตราการรอดชีวิตของ *Streptococcus thermophilus* และ *L. bulgaricus* สูงกว่าการทำแห้งด้วยวิธีผงแห้ง และปริมาณ *S. thermophilus* ที่รอดชีวิตภายหลังการทำแห้งโดยวิธีผงแห้งมีเพียงครึ่งหนึ่งของการทำแห้งด้วยวิธีเยือกแข็ง เนื่องจากการทำแห้งแบบผงแห้งใช้อุณหภูมิสูงกว่าการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ในขณะที่ปริมาณ *L. bulgaricus* ที่รอดชีวิตภายหลังการทำแห้งทั้ง 2 วิธีมีค่าใกล้เคียงกัน

การทำแห้งแบบเยือกแข็ง

การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Drying หรือ Lyophilization) เป็นกระบวนการที่ถูกนำมาใช้เพื่อเก็บรักษาสารชีวภาพ โดยไม่ทำให้คุณสมบัติประจำตัวของสารสูญเสียไป (Mellor, 1978) เมื่อเปรียบเทียบกับการทำแห้งแบบผงแห้ง การทำแห้งแบบเยือกแข็งใช้อุณหภูมิในการทำแห้งต่ำกว่าทำให้ไม่ได้รับการสูญเสียเนื่องจากความร้อน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำแห้งแบบเยือกแข็งจะได้รับความกระทบกระเทือนเพียงเล็กน้อย (Lingle, 1986) สารชีวภาพที่นิยมนำมาทำแห้งแบบเยือกแข็งสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ เซลล์ไม่มีชีวิต (non-living matter) เช่น blood plasma, serum, hormone และผลิตภัณฑ์อาหาร อีกกลุ่ม ได้แก่เซลล์ที่มีชีวิต (living cells) ซึ่งต้องการคงความมีชีวิตรอดของเซลล์ไว้ในระยะเวลานาน ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และไวรัส

สำหรับหลักการทำงานของเครื่อง Freezed Dryed หรือ Lyophilizer จะเป็นการทำให้เซลล์จุลินทรีย์หรือสารชีวภาพแข็งตัวโดยการลดอุณหภูมิ ความดัน และกระทำภายใต้ภาวะสูญญากาศ โดยอาศัยหลักการระเหิด (Sublimating) และการคาย (Desorbsion) ดึงน้ำในเซลล์ออก ทำให้จุลินทรีย์ที่อยู่ภายใต้สภาวะการเก็บที่อุณหภูมิต่ำอยู่ในภาวะพักตัว มีการลดลงของแอคติวิตี และกิจกรรมของเอนไซม์แต่ก็ยังคงสมบัติของเอนไซม์ไว้ได้โดยไม่ถูกทำลาย เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้น

ใหม่เอนไซม์ก็สามารถทำงานได้ตามปกติ (Robinson, 1981, Norris และ Ribbon, 1970) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้ (พรเทพ, 2538, Mellor, 1978, Day และ McLellan, 1995)

1. Prefreezing สารชีวภาพที่ถูกเตรียมในรูปของเหลวจะถูกแช่แข็งภายใต้อุณหภูมิต่ำในอ่าง (chamber) ที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีจุดเยือกแข็งต่ำ เช่น เมทานอล เป็นตัวให้ความเย็น เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนนี้ของเหลวจะถูกเปลี่ยนสถานะกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง

2. Primary Drying (Sublimating) ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นถูกระเหิดจนกลายเป็นไอโดยการให้ความร้อนในสภาพสูญญากาศ การระเหิดจะเกิดขึ้นบริเวณผิวหน้าก่อนและจะค่อย ๆ ครอบคลุมเข้าไปถึงบริเวณชั้นใน โดยอาศัยความแตกต่างของอุณหภูมิระหว่างแหล่งพลังงานความร้อนและน้ำแข็งบริเวณผิวหน้า (temperature gradient) ทำให้พลังงานความร้อนถูกส่งผ่านจากชั้นน้ำแข็งที่อยู่ภายในมาสู่น้ำแข็งบริเวณผิวหน้า ไอที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วนี้จะถูกกำจัดออกภายใต้ภาวะสูญญากาศอาศัยกระบวนการ mass transport ซึ่งเกิดขึ้นโดยความแตกต่างระหว่างความดัน (pressure gradient) ระหว่างผิวหน้าน้ำแข็งและส่วนที่ให้ความเย็น (refrigerated condenser) รวมทั้งการใช้สาร chemical dessicant ที่มีประสิทธภาพสูง ได้แก่ ฟอสฟอรัสเพนตะออกไซด์ (P_2O_5) เข้าไปจับไอน้ำแข็งที่เกิดขึ้น แต่จะทำได้ในปริมาณที่จำกัดเท่านั้น การกำจัดไอจะเกิดได้ดีหากว่าทำในส่วนให้ความเย็น (refrigerated condenser) ที่อุณหภูมิ –50 $^{\circ}$ ซ สำหรับในเซลล์ที่มีชีวิตทั่วไป ได้แก่ แบคทีเรีย ภายในส่วนไซโตพลาสมโดยทั่วไปจะมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ free water ซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์และสารประกอบเกลือแร่ต่าง ๆ ในส่วน inter และ intra-cellular spaces ส่วนน้อยจะประกอบด้วย bound water ซึ่งจะเชื่อมกับ macromolecules ในเซลล์ด้วย electrostatic forces หรือพันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงมาก ในขั้นตอนนี้จะเกิดผลึกน้ำแข็งในส่วน free water และจะถูกดึงออกอย่างง่ายดาย ซึ่งจะไม่เกิดขึ้นใน bound water หลังสิ้นสุดขั้นตอนนี้จะมีน้ำหรือความชื้นหลงเหลืออยู่ประมาณ 25-30 กรัมต่อปริมาณผลิตภัณฑ์ 100 กรัม หรือประมาณ 20–30 %

3. Secondary drying (Desorbsion) เป็นขั้นตอนสุดท้ายของการดึงน้ำออก โดยจะดึงน้ำที่ยังหลงเหลืออยู่ในรูป bound water ซึ่งไม่ได้ถูกทำให้เป็นน้ำแข็งในขั้นตอน Prefreezing ออก bound water จะได้รับพลังงานความร้อนอย่างช้า ๆ จนน้ำกลายเป็นไอ (evaporation) เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีลักษณะแห้ง มีน้ำหนักเบา มีปริมาณความชื้นเหลืออยู่ประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด

การทำแห้งแบบเยือกแข็งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการเก็บรักษาหัวเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย เพื่อใช้ในทางอุตสาหกรรมมากกว่าวิธีอื่น เนื่องจากยังคงอัตราการรอดชีวิตไว้ได้ในระดับสูงเมื่อเก็บในระยะเวลานาน (พรเทพ, 2538) ประหยัดเนื้อที่ในการเก็บรักษา รวมทั้งสะดวกและนำไปใช้

งานง่าย (Kets และคณะ, 1996) ในการทดลองนี้จึงนำ *Lactobacillus* spp. ทำแห้งแบบเยือกแข็งและเก็บรักษาในรูปเซลล์ผงแห้งภายใต้อุณหภูมิต่ำและตรวจสอบการรอดชีวิตหลังเก็บรักษานาน 12 เดือน เพื่อนำ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งใช้ในรูปโพรไบโอติกเสริมในการเลี้ยงไก่ในการทดลองภาคสนาม ซึ่งคาดว่าน่าจะนำมาใช้ทดแทนการเสริมสารปฏิชีวนะในอาหารไก่ได้ต่อไปในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

จุลินทรีย์

Lactobacillus spp. แยกได้จากตัวอย่างลำไส้ไก่ จากตลาดสดในกรุงเทพมหานคร มีจำนวน 4 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแกงเข้มข้น 5% และเกลือน้ำดี 5% ทั้ง 4 ชนิดดื้อต่อสารปฏิชีวนะ ได้แก่ แวนโคมัยซินความเข้มข้น 250 ไมโครกรัม และซัลฟาเมทาซีนความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม สามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในไก่และคนจากการทดลอง *in vitro test* ได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis, S. Typhimurium และ *Staphylococcus aureus* รวมทั้งมีสมบัติเป็นโพรไบโอติก สามารถเพิ่มการเจริญเติบโต และต้านทานการติดเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ในไก่กระทง ได้จากการทดสอบภาคสนาม ทั้ง 4 สายพันธุ์ได้รับการยืนยันผลการศึกษาของการจำแนกกลุ่มและชนิดซึ่งตรงกันกับการพิสูจน์เอกลักษณ์จาก MIRCEN กรุงเทพ ฯ (ฐิติพงศ์ ธนะรัชดิการนนท์, 2539) และได้รับมอบหมายหมายเลขของแบคทีเรีย ดังนี้ คือ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338, *L. bulgaricus* TISTR 1339, *L. casei* subsp. *tolerans* TISTR 1341 และ *L. jensenii* TISTR 1342

Salmonella Typhimurium จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ S. Typhimurium ได้รับเอื้อเฟื้อจากคณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, S. Typhimurium แยกจากผู้ป่วยที่มีอาการของโรค enteric fevers เอื้อเฟื้อจากคณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ S. Typhimurium strain B ซึ่งมีสมบัติดื้อต่อสเตร็ปโตมัยซินที่ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, ไวต่อคลอเตตราซัยคลิน และเพนนิซิลลินที่ความเข้มข้น 12 และ 16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เอื้อเฟื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการทดลอง

1. นำ *Lactobacillus* spp. แยกได้จากตัวอย่างลำไส้ไก่ เก็บรักษาในรูปผงแห้ง (Lyophilized cells) และตรวจสอบการรอดชีวิต (viability) ทุก 3 เดือน จนครบ 12 เดือน

1.1 เก็บรักษาเซลล์ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยวิธีแช่แข็งและแห้ง (Lyophilization) ดังนี้

preculture โดยเพาะเชื้อ 1 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแลคโตบาซิลไลเอ็ม อาร์ เอส ปริมาตร 250 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก ข้อ 1) บ่มที่อุณหภูมิ 36°ซ นาน 24-48 ชั่วโมง ถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 3% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแลคโตบาซิลไลเอ็ม อาร์ เอส ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บ่มที่ 36 °ซ จนเซลล์เข้าสู่ช่วงปลาย log phase จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยเขย่าให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันและถ่ายลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว พร้อมผสมอาหารนมพร่องมันเนย 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ลงในอัตราส่วน 1: 1 ปริมาตรอย่างละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนนำไปเข้าเครื่องทำให้แข็งและแห้ง (Lyophilizer) ต่อไป หลังจากสิ้นสุดทุกขั้นตอนในการทำให้แข็งและแห้ง ตัวอย่างที่ได้จะมีลักษณะแห้ง นำไปเก็บรักษาที่ -20°ซ

1.2 ตรวจสอบการรอดชีวิต (viability) ของเซลล์ในรูปผงแห้งทั้ง 4 สายพันธุ์ ภายใต้ภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ ทุก 3 เดือน ตั้งแต่ 0, 3, 6, 9 และ 12 เดือน ตามลำดับ

นำเซลล์ในรูปผงแห้งของแต่ละสายพันธุ์ ตรวจสอบการรอดชีวิต โดยชั่งตัวอย่าง 1 กรัม นำมาทำ serial dilution ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนัก/ปริมาตร) การสุ่มตัวอย่างทำ 3 ซ้ำในแต่ละสายพันธุ์ ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total cell counts (CFU/ g)) (ภาคผนวก ค ข้อ 1) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส ทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 24-48 ชั่วโมง

2. เปรียบเทียบการรอดชีวิต (viability) ของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อนำมาผสมในน้ำดื่มและในอาหารไก่สำเร็จรูป

2.1 ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแลคติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารไก่สำเร็จรูปผสมสารปฏิชีวนะ 3 ขนาด โดยชั่งตัวอย่าง 1 กรัม นำมาทำ dilution ที่เหมาะสมในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหารเลี้ยง

เชื้อแข็งทริปติก ซอย (ภาคผนวก ก ข้อ 3) ควบคู่ไปกับการทำ heat shock bacteria โดยนำหลอด dilution ที่เหมาะสม ต้มที่อุณหภูมิ 80°ซ นาน 10 นาที เมื่อครบเวลาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติก ซอย จากนั้นตรวจนับจำนวนแลคติกแอซิดแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส ที่มีบรอมเครซอลเพอเพิลเป็นอินดิเคเตอร์

2.2 ตรวจสอบการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ในน้ำดื่มและในอาหารไก่ โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 10^9 CFU/g ในอัตราส่วน 1:1:1:1 (น้ำหนัก / น้ำหนัก) ผสมลงในน้ำกรอง และอาหารไก่สำเร็จรูปในอัตราส่วน 1:1000 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ 1 :1000 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 21 °ซ และ 30°ซ เมื่อครบทุก 12 ชั่วโมง ตรวจสอบการรอดชีวิตโดยสุ่มตัวอย่างนำมาทำ serial dilution ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนัก/ ปริมาตร) ตรวจสอบจำนวน *Lactobacillus* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส ทำ 2 ซ้ำ

3. การทดสอบภาคสนามเพื่อตรวจสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการเจริญเติบโตของไก่พันธุ์เนื้อ

ใช้ลูกไก่พันธุ์เนื้อ CB-13 -97 C-CN คละเพศ อายุ 1 วัน ทำการเลี้ยง 42 วัน จำนวน 480 ตัว โดยแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 5 กลุ่ม (Treatment) กลุ่มละ 12 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ลูกไก่ 8 ตัว รวม 96 ตัว ทั้ง 5 กลุ่ม 480 ตัว ให้อาหารไก่สำเร็จรูปของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ (มหาชน) จำกัด คือ สูตรผสมสารปฏิชีวนะ CB-I-852 เม็ดเล็ก สำหรับไก่เล็ก (1-19 วัน) และ CB-II-852 เม็ดกลาง สำหรับไก่รุ่น (19-42 วัน) สูตรไม่ผสมสารปฏิชีวนะ CB-I-853 เม็ดเล็ก สำหรับไก่เล็ก (1-19 วัน) และ CB-II-853 เม็ดกลาง สำหรับไก่รุ่น (19-42 วัน) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มควบคุม ไก่ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะ สูตร CB-I-852 และ CB-II-852 ตามช่วงอายุ

กลุ่มที่ 2 ไก่ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะ สูตร CB-I-852 และ CB-II-852 ตามช่วงอายุ และผสมโพรไบโอติก

กลุ่มที่ 3 ไก่ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะ สูตร CB--I-852 และ CB-II-852 ตามช่วงอายุ และผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม

กลุ่มที่ 4 ไก่ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะ สูตร CB-I-853 และ CB-II-853 ตามช่วงอายุ และผสมโพรไบโอติก

กลุ่มที่ 5 ไก่ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะ สูตร CB-I-853 และ CB-II-853 ตามช่วงอายุ และผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม

ในไก่กลุ่มทดลองที่ได้รับโพรไบโอติก จะให้เชื้อทุก 3 วันนับตั้งแต่ไก่อายุ 1 วัน โดยอดน้ำและอาหารก่อนไก่ได้รับโพรไบโอติก หลังจากผสมในอาหารและในน้ำดื่มแล้วมีความเข้มข้น 10^6 CFU/g หรือ CFU/ml ตามลำดับ ทำการชั่งน้ำหนักไก่เมื่ออายุ 0, 19 และ 42 วัน เพื่อเปรียบเทียบและติดตามผลการเจริญเติบโตในแต่ละกลุ่มทดลอง และทุก 9 วัน สุ่มฆ่าไก่กลุ่มละ 3 ตัว ผ่าตัดนำลำไส้ไก่มาทำ Total viable cell count ของแบคทีเรียประจำถิ่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย และตรวจสอบ ความสามารถในการอยู่รอดในลำไส้ไก่ของ *Lactobacillus* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิลไลเอ็ม อาร์ เอส นำโคโลนีที่ได้ตรวจสอบยืนยันผลโดยดูลักษณะการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การทดสอบการสร้างเอ็นไซม์คะตะเลส การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ(ภาคผนวก ข ข้อ 1)

4. การทดสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S.* Typhimurium ในไก่พันธุ์เนื้อ

ใช้ลูกไก่พันธุ์เนื้อ CB-14 -97 C-CN คละเพศ อายุ 1 วัน ทำการเลี้ยง 36 วัน จำนวน 384 ตัว โดยแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 6 กลุ่ม (Treatment) กลุ่มละ 8 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ลูกไก่ 8 ตัว รวม 64 ตัว รวม 6 กลุ่ม 384 ตัว โดยป้อน *S.* Typhimurium ให้ไก่ในแต่ละกลุ่มทดลอง จำนวน 3 ครั้ง คือ ไก่อายุ 1 วัน ให้ 10^3 CFU/ml อายุ 12 วัน ให้ 10^6 CFU/ml ใช้สายพันธุ์ที่ได้รับจากคณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และอายุ 21 วัน ให้ 10^9 CFU/ml ใช้สายพันธุ์ก่อให้เกิดโรค enteric fevers ในคน เอื้อเฟื้อจากคณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุก 3 วันผสม *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารและน้ำดื่ม 10^6 CFU/g และ CFU/ml ตามลำดับ ให้ไก่ตั้งแต่อายุ 1 วัน จัดกลุ่มทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ไก่ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะสูตร CB-I-8521 และ CB-II- 852 ตามช่วงอายุ และให้ *S.* Typhimurium

กลุ่มที่ 2 ไก่ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะสูตร CB-I-852 และ CB-II- 852 ตามช่วงอายุและผสมโพรไบโอติก และให้ *S.* Typhimurium

กลุ่มที่ 3 ไก่ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะสูตร CB-I-852 และ CB-II- 852 ตามช่วงอายุ และผสมโพรไบโอติก

กลุ่มที่ 4 ไก่ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะสูตร CB-I-853 และ CB-II- 853 ตามช่วงอายุ และให้ *S.* Typhimurium

กลุ่มที่ 5 ไก่ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะสูตร CB-I-853 และ CB-II- 853 ตามช่วงอายุและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่มและให้ *S.* Typhimurium

กลุ่มที่ 6 ไก่ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะสูตร CB-I-853 และ CB-II- 853 ตามช่วงอายุและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม

ทำการชั่งน้ำหนักไก่เมื่ออายุ 1, 19 และ 36 วัน เพื่อเปรียบเทียบและติดตามผลการเจริญเติบโตในแต่ละกลุ่มทดลอง และทุก 9 วัน สุ่มฆ่าไก่กลุ่มละ 2 ตัว ผ่าตัดนำลำไส้ไก่มาทำ Total viable cell count ของแบคทีเรียประจำถิ่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติก ซอย ตรวจสอบความสามารถในการอยู่รอดในลำไส้ไก่และต้านทานการติดเชื้อ *S.* Typhimurium ของ *Lactobacillus* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิลไลเอ็ม อาร์ เอส นำโคโลนีที่ได้ตรวจสอบยืนยันผลโดยดูลักษณะการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การทดสอบการสร้างเอ็นไซม์คะตะเลส การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ การตรวจหาปริมาณ *S.* Typhimurium modified จากวิธี Standard Conventional Method (BAM/AOAC/Canada/ISO) (ภาคผนวก ข ข้อ 3) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซาลโมเนลลา ชิเจลลา (ภาคผนวก ก ข้อ 4) พร้อมทั้งตรวจสอบยืนยันผลทางชีวเคมีในอาหารเลี้ยงเชื้อที เอส ไอ (Triple Sugar Iron agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 5), แอล ไอ เอ (Lysine Indole agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 6) และอาหารทดสอบการเคลื่อนที่และสร้างอินโดล (Semisolid Indole Motility Test Medium) (ภาคผนวก ก ข้อ 7)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเก็บข้อมูลและการคำนวณ

การทดลองภาคสนามเพื่อตรวจสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการเจริญเติบโตของไก่ การทดสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ S. Typhimurium ในไก่พันธุ์เนื้อ และการทดสอบยืนยันผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ S. Typhimurium ในไก่พันธุ์พื้นบ้านไทย มีข้อมูลที่ต้องบันทึกและคำนวณ คือ

1. การเจริญเติบโต โดยการชั่งน้ำหนักในแต่ละซ้ำแล้วเฉลี่ย นำน้ำหนักเฉลี่ยในแต่ละซ้ำรวมกันแล้วเฉลี่ยเป็นน้ำหนักเฉลี่ยรวม คำนวณน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นในแต่ละช่วงเวลา
2. ปริมาณอาหารที่ไก่แต่ละกลุ่มกิน
3. คำนวณประสิทธิภาพการใช้อาหาร (feed conversion) โดยใช้สูตร

$$\text{ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (FCR)} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ไก่กิน}}{\text{น้ำหนักตัวไก่ที่เพิ่มขึ้น}}$$

4. คำนวน % ความสัมพันธุ์ของน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้น

$$\%\ \text{ความสัมพันธุ์ของน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้น} = \frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นในไก่กลุ่มทดลอง- น้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นในไก่กลุ่มควบคุม}}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นในไก่กลุ่มทดลอง}} \times 100$$

5. อัตราการตายโดยคิดเป็นร้อยละของไก่แต่ละกลุ่มทดลอง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำน้ำหนักเฉลี่ยและค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่ในแต่ละกลุ่มทดลองวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ด้วยความแปรปรวน (Analysis of variance) ใช้ SPSS-PC Program for probit analysis ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบผลการทดลองโดยใช้ Duncan's multiple range test (จรัญ, 2534)

สถานที่ทดลอง

1. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใช้เพื่อเตรียม *Lactobacillus* spp. ผงแห้ง และ *S.* Typhimurium เพื่อทดสอบภาคสนาม และใช้ในการทดสอบยืนยันผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S.* Typhimurium ในไก่พันธุ์พื้นบ้านไทย

อุปกรณ์การทดสอบภาคสนาม มีดังนี้

1. กรงเลี้ยงมีขนาด 23.5 x 24 x 28 นิ้ว ใช้เลี้ยงลูกไก่ตั้งแต่อายุ 1 - 30 วัน

2. หลอดไฟสำหรับกกลูกไก่ขนาด 60 วัตต์ กรงละ 1 ดวง

3. ใช้ขวดน้ำพลาสติกขนาด 2.5 ลิตร 1 ขวดต่อกรง และรางอาหารสำหรับไก่เล็กในช่วง 1-10 วัน 1 รางต่อกรง ช่วง 10-20 วัน 2 รางต่อกรง และช่วง 20-30 วัน ใช้รางอาหารสำหรับไก่ใหญ่ 2 รางต่อกรง

2. ฟาร์มทดลองโรงเรือนเลี้ยงไก่ของบริษัท กรุงเทพอาหารสัตว์ จำกัด กม. 21 ถนนบางนา-ตราด ใช้ในการทดสอบภาคสนามเพื่อดูผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการเจริญเติบโตของไก่ และการทดสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S.* Typhimurium ในไก่พันธุ์เนื้อ

อุปกรณ์การทดสอบภาคสนาม มีดังนี้

1. กรงเลี้ยงเป็นกรงตับพื้นลวด 4 ชั้น แต่ละชั้นมีขนาด 92 x 37 x 12 นิ้ว จำนวน 4 กรง ใช้เลี้ยงลูกไก่ ตั้งแต่อายุ 1- 42 วัน

2. หลอดไฟสำหรับกกลูกไก่ขนาด 60 วัตต์ กรงละ 1 ดวง

3. ขวดน้ำและรางอาหารสำหรับไก่เล็ก (1- 18 วัน)

ช่วง 1-10 วันแรก ใช้ขวดน้ำพลาสติกสำหรับไก่เล็ก ขนาด 2.5 ลิตร ต่อกรง

ช่วง 11-18 วัน ใช้รางน้ำติดข้างกรงตับ 1 รางต่อ 2 กรง และใช้รางอาหารสำหรับไก่เล็ก 1 รางต่อกรง

4. รางน้ำและรางอาหารสำหรับไก่ใหญ่ (19-42 วัน) ใช้รางน้ำและรางอาหารติดข้างกรงตับโดยเฉพาะอย่างละ 1 รางต่อ 4 กรง

พันธุ์ไก่และอาหารไก่

1. การทดสอบภาคสนามเพื่อตรวจสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการเจริญเติบโตของไก่ใช้ลูกไก่พันธุ์เนื้อ CB-13-97 C-CN อายุ 1 วัน คละเพศ ของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ มหาชน จำกัด และการทดสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S.* Typhimrium ในไก่พันธุ์เนื้อ ใช้ลูกไก่พันธุ์เนื้อ CB-14-97 C-CN อายุ 1 วัน คละเพศของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ มหาชน จำกัด

การทดสอบภาคสนามทั้ง 2 การทดลองใช้อาหารไก่ 2 สูตรของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ (มหาชน) จำกัด เช่นเดียวกัน คือ

1. CB-I-852 อาหารเม็ดเล็กใช้สำหรับไก่เล็กอายุ 1-18 วัน และ CB-II-852 อาหารเม็ดกลางใช้สำหรับไก่รุ่นอายุ 20-42 วัน ซึ่งเป็นสูตรทางการค้าผสมสารปฏิชีวนะ

2. CB-I-853 อาหารเม็ดเล็กใช้สำหรับไก่เล็กอายุ 1-18 วัน และ CB-II-853 อาหารเม็ดกลางใช้สำหรับไก่รุ่นอายุ 20-42 วัน ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ไม่ผสมสารปฏิชีวนะ

3. การทดสอบยืนยันผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S.* Typhimurium ในไก่พันธุ์พื้นบ้านไทย ใช้ลูกไก่พันธุ์พื้นบ้านไทย อายุ 1 วัน คละเพศ

อาหารไก่สำเร็จรูปใช้ของบริษัทซนะพันธุ์อุตสาหกรรม จำกัด อายุ 1-19 วัน ให้อาหารสูตร 1 เม็ดเล็กละเอียด อายุ 20- 30 วัน ให้อาหารสูตร 2 เม็ดใหญ่

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปวิธีการทดลอง

1. แผนภูมิการทดสอบภาคสนามเพื่อตรวจสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการเจริญเติบโตของไก่

ผสม *Lactobacillus* spp. ผงแห้ง 4 สายพันธุ์

อัตราส่วน 1:1:1:1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก)

⇓

ผสมในอาหารไก่สำเร็จรูปชนิดเม็ดและน้ำดื่ม

อัตราส่วน 1:1,000 มีความเข้มข้นสุดท้าย 10^6 CFU/g และCFU/ml

ตรวจสอบความเข้มข้นจากตัวอย่างน้ำและอาหาร

⇓

นำโพรไบโอติกให้ไก่กิน ทุก 3 วัน ตั้งแต่ไก่อายุ 1 วัน

ไก่ 1 กลุ่มประกอบด้วย 12 ซ้ำ ซ้ำละ 8 ตัว รวม 96 ตัว ทั้งหมด 5 กลุ่ม 480 ตัว ดังนี้

1. กลุ่มควบคุม ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะ
2. ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติก
3. ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม
4. ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติก
5. ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม

⇓

สุ่มตัวอย่างลำไส้ไก่กลุ่มทดลองละ 3 ตัว ทุก 9 วัน ตรวจหา

- จำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย
- แลคติกแอซิดแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส

⇓ ทำ 2 ซ้ำ

ทดสอบยืนยันผลโคโลนีของ *Lactobacillus* spp. ด้วยวิธีทางชีวเคมี

⇓

ดูผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่

โดยชั่งน้ำหนักและปริมาณอาหารที่กิน ทุก 1, 19 และ 42 วัน

2. แผนภูมิการทดสอบภาคสนามเพื่อตรวจสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S.* Typhimurium ในไก่พันธุ์เนื้อ

ผสม *Lactobacillus* spp. ผงแห้ง 4 สายพันธุ์

อัตราส่วน 1:1:1:1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก)

⇓

ผสมในอาหารไก่สำเร็จรูปชนิดเม็ดและในน้ำดื่ม

อัตราส่วน 1:1,000 มีความเข้มข้นสุดท้าย 10^6 CFU/g และ CFU/ml

ตรวจสอบความเข้มข้นจากตัวอย่างน้ำและอาหาร

⇓

นำโพรไบโอติกให้ไก่กิน ทุก 3 วัน

ไก่ 1 กลุ่มประกอบด้วย 8 ซ้ำ ซ้ำละ 8 ตัว รวม 64 ตัว ทั้งหมด 6 กลุ่ม 384 ตัว ดังนี้

1. กลุ่มควบคุมได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะ + ป้อน *S.* Typhimurium
2. ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติก + ป้อน *S.* Typhimurium
3. ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติก
4. ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะ + ป้อน *S.* Typhimurium
5. ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม + ป้อน *S.* Typhimurium
6. ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม

⇓

ป้อน *S.* Typhimurium จำนวน 3 ครั้ง คือ

อายุ 1 วัน (10^3 CFU/ml) อายุ 12 วัน (10^6 CFU/ml) และ 21 วัน (10^8 CFU/ml)

⇓

สุ่มตัวอย่างลำไส้ไก่กลุ่มทดลองละ 2 ตัว ทุก 9 วัน ตรวจหา

- จำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกซอย
- แลคติกแอซิดแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส
- *S.* Typhimurium บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซาลโมเนลลา ชิเจลลา

⇓

⇓

นำโคโลนีที่คาดว่าเป็น *Lactobacillus* spp.

และ S. Typhimurium ทดสอบยืนยันผลด้วยวิธีทางชีวเคมี

⇓

ดูผลของโพรไบโอติกต่อการต้านทานการติดเชื้อ S. Typhimurium

การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่ โดยชั่งน้ำหนัก

และปริมาณอาหารที่กิน ทุก 1, 19 และ 36 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การตรวจสอบการรอดชีวิตของหัวเชื้อ *Lactobacillus* spp. ผงแห้ง จำนวน 4 สายพันธุ์ ภายใต้สภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °ซ นาน 12 เดือน

นำ *Lactobacillus spp.* 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. acidophilus* TISTR 1338, *L. bulgaricus* TISTR 1339, *L. casei* subsp. *tolerans* TISTR 1341 และ *L. jensenii* TISTR 1342 ไปทำให้แข็งและแห้ง เก็บรักษาที่ -20 °ซ ตรวจสอบการรอดชีวิต (viability) ทุก 0, 3, 6 , 9 และ 12 เดือน ตามลำดับ นำค่า log total count (CFU/g) คำนวนหา % log viability ตามสูตรได้ผลดังตารางที่ 2

$$\% \text{ viability} = \frac{\text{log total count ของจำนวนเซลล์สุดท้าย}}{\text{log total count ของจำนวนเซลล์ตั้งต้น}} \times 100$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 log total count และ % viablity ของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้ง จำนวน 4 สายพันธุ์ เมื่อเก็บรักษาที่ -20 ^{0} ซ นาน 12 เดือน

เวลา (เดือน)	*Lactobacillus spp.* ผงแห้ง ที่ –20 ^{0}ซ							
	L. acidophilus TISTR 1338		*L. bulgaricus* TISTR 1339		*L. casei* subsp. *tolerans* TISTR 1341		*L. jensenii* TISTR 1342	
	Log total count (CFU/g)	%viability	Log total count (CFU/g)	%viability	Log total count (CFU/g)	%viability	Log total count (CFU/g)	%viability
0	9.88	100.0	9.91	100.0	10.15	100.0	10.26	100.0
3	9.81	99.3	9.86	99.5	10.09	99.4	10.16	99.0
6	9.78	98.9	9.83	99.2	10.08	99.3	10.13	98.7
9	9.75	98.7	9.79	98.8	10.05	99.0	10.11	98.5
12	9.65	97.7	9.72	98.1	9.96	98.1	10.03	97.8

ผลการทดลองจากตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าสามารถเก็บรักษา *Lactobacillus* spp. ในรูปผงแห้งโดยใช้อาหารนมพร่องมันเนย 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารป้องกันความเย็นได้ และอุณหภูมิ -20 ^{0} ซ เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษา *Lactobacillus* spp. ผงแห้ง โดยหลังจากเก็บรักษาครบ 12 เดือน *Lactobacillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์มีการรอดชีวิตสูงกว่าร้อยละ 97 โดย *L. bulgaricus* TISTR 1339 และ *L. casei* subsp. *tolerans* TISTR 1341 มีการรอดชีวิตสูงสุดเท่ากันคิดเป็นร้อยละของ viability เท่ากับ 98.1 รองลงมาได้แก่ *L. acidophilus* TISTR 1338 และ *L. jensenii* TISTR 1342 คิดเป็นร้อยละของ viability เท่ากับ 97.8 และ 97.7 ตามลำดับ

2. การเปรียบเทียบการรอดชีวิต (viability) ของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ในน้ำดื่มและในอาหารไก่สำเร็จรูป

2.1 นำอาหารไก่สำเร็จรูปทั้ง 3 ขนาด ตรวจหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด โดยการทำ serial dilution เจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และทำ heat shock เพื่อตรวจหาปริมาณ *Bacillus* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติก ซอย และตรวจสอบจำนวนแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (ล.อ.บ.) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส ผสมบรอมเครซอลเพอเพิล ผลการตรวจไม่พบ ล.อ.บ. สำหรับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในอาหารไก่อยู่ระหว่าง10^6 - 10^8 CFU/g จำนวน *Bacillus* spp. ที่ตรวจพบอยู่ระหว่าง 1.5– 9.5 x 10^5 CFU/g แสดงผลดังตารางที่ 3 ดังนั้นในงานวิจัยนี้สามารถใช้ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติกเสริมในอาหารไก่ได้โดยไม่มีการปนเปื้อนของ ล.อ.บ. จากอาหารไก่

ตารางที่ 3 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด, *Bacillus* spp. และแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ตรวจพบในอาหารไก่เม็ดสำเร็จรูปของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ มหาชน จำกัด

อาหารไก่	จำนวนแบคทีเรียที่ตรวจพบ (CFU/g)		
	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด	*Bacillus* spp.	แลคติกแอซิดแบคทีเรีย
เม็ดเล็กละเอียด (ไก่เล็ก 1-19 วัน)	6.8 x 10^8	7.7 x 10^5	ตรวจไม่พบ
เม็ดปานกลาง (ไก่โตกลาง 20-42 วัน)	1.7 x 10^8	1.5 x 10^5	ตรวจไม่พบ
เม็ดใหญ่ (ไก่โตใหญ่ 43 วันขึ้นไป)	8.5 x 10^8	9.5 x 10^5	ตรวจไม่พบ

2.2 นำ *Lactobacillus* spp. ผงแห้ง จำนวน 4 สายพันธุ์แต่ละสายพันธุ์มีความเข้มข้น 10^9 CFU/g ผสมกันในอัตราส่วน 1:1:1:1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ผสมลงในน้ำกรอง และในอาหารไก่สำเร็จรูปในอัตราส่วน 1:1,000 (น้ำหนัก/ ปริมาตร) และ 1:1,000 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ตามลำดับ มีความเข้มข้นหลังเติม 10^6 CFU/g แบ่งชุดทดลองเป็น 2 ชุด ได้แก่ ชุดที่ 1 บ่มที่อุณภูมิ 21^0ซ และชุดที่ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 30^0ซ ตรวจนับจำนวนแลคติกแอซิดแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง แลคโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส ทุก 12 ชม. ผลแสดงดังตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ

ในน้ำกรองตรวจพบการเจริญเพิ่มขึ้นของ *Lactobacillus* spp. ตลอดการทดลองทั้ง 2 อุณหภูมิ โดยจำนวนเซลล์สูงสุดตรวจพบที่ 21^0ซ อยู่ระหว่าง 36-48 ชั่วโมง ใกล้เคียงกับที่ 30^0ซ ตรวจพบที่ 24-36 ชั่วโมง มีค่ามากกว่าปริมาณเซลล์ตั้งต้นประมาณ 1 log cycle และเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ชั่วโมง 84 ปริมาณเซลล์ที่พบมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณเซลล์ตั้งต้นประมาณ 10^6 CFU/ml แสดงว่า *Lactobacillus* spp. สามารถใช้ในรูปผงแห้งละลายน้ำได้ โดยสามารถเจริญเพิ่มจำนวน และมีชีวิตอยู่ในน้ำได้นานกว่า 3 วัน ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสม จำนวน 4 สายพันธุ์ในน้ำกรองที่อุณหภูมิ 21^0ซ และ 30^0ซ

เวลา (ชม.)	21^0ซ		30^0ซ	
	จำนวน *Lactobacillus* spp. (CFU/ml)	pH	จำนวน *Lactobacillus* spp. (CFU/ml)	pH
0	9.5×10^6	7.0	9.4×10^6	7.0
12	1.7×10^7	5.7	2.5×10^7	5.7
24	2.9×10^7	5.7	7.3×10^7	5.4-5.5
36	7.2×10^7	5.4-5.5	7.1×10^7	5.4-5.5
48	7.4×10^7	5.4-5.5	5.0×10^7	5.4-5.5
60	1.5×10^7	5.4-5.5	3.0×10^7	5.4-5.5
72	9.8×10^6	5.4-5.5	1.9×10^7	5.4-5.5
84	8.8×10^6	5.4-5.5	9.5×10^6	5.4-5.5

ผลการทดลองในอาหารไก่สำเร็จรูปทั้ง 3 ขนาด ตรวจพบจำนวน *Lactobacillus* spp. ลดลงตลอดการทดลองทั้งที่อุณหภูมิ 21^{0} ซ และ 30^{0} ซ ผลการทดลองที่ชั่วโมง 60 จำนวนเซลล์ที่ตรวจพบต่ำกว่าปริมาณเซลล์ตั้งต้นประมาณ 1-2 log cycle และที่ชั่วโมงที่ 72 ส่วนใหญ่ตรวจไม่พบ เนื่องจากเกิดการเจริญของ *Bacillus* spp. ปกคลุมโคโลนีอื่น ๆ จนไม่สามารถอ่านผลได้ และจำนวนเซลล์ที่ตรวจพบในอาหารไก่แต่ละขนาดมีปริมาณแตกต่างกัน โดยอาหารไก่เม็ดเล็กมีอัตราการลดลงของเซลล์ที่ตรวจพบต่ำกว่าเม็ดกลางและเม็ดใหญ่ทั้ง 2 อุณหภูมิ อาจมีสาเหตุมาจาก *Lactobacillus* spp. เตรียมในรูปผงแห้งสามารถปะปนและผสมเป็นเนื้อเดียวกับอาหารเม็ดเล็กได้ดีกว่าและไม่เกิดการสูญเสียมากเมื่อสุ่มตัวอย่าง ดังนั้น *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมสามารถนำไปใช้ผสมในอาหารไก่ได้โดยช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับใช้เติมในอาหารไก่ทั้ง 3 ขนาดอยู่ในช่วง 0-12 ชั่วโมง (10^{6} CFU/g) ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสม จำนวน 4 สายพันธุ์ในอาหารไก่สำเร็จรูปทั้ง 3 ขนาด ที่อุณหภูมิ 21 ^{0}ซ และ 30 ^{0}ซ

เวลา (ชม)	จำนวนแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ 21 ^{0}ซ (CFU/g)			จำนวนแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ 30 ^{0}ซ (CFU/g)		
	อาหารเม็ดเล็ก	อาหารเม็ดกลาง	อาหารเม็ดใหญ่	อาหารเม็ดเล็ก	อาหารเม็ดกลาง	อาหารเม็ดใหญ่
0	5.1×10^{6}	4.2×10^{6}	4.0×10^{6}	3.7×10^{6}	2.0×10^{6}	2.6×10^{6}
12	3.0×10^{6}	2.8×10^{6}	2.5×10^{5}	1.1×10^{6}	2.2×10^{6}	1.1×10^{6}
24	1.5×10^{6}	9.5×10^{5}	8.8×10^{4}	1.9×10^{6}	1.0×10^{5}	6.8×10^{5}
36	9.8×10^{5}	8.8×10^{5}	5.3×10^{4}	3.0×10^{5}	1.5×10^{5}	6.5×10^{4}
48	8.6×10^{5}	3.7×10^{5}	8.0×10^{4}	3.9×10^{5}	4.0×10^{4}	6.0×10^{4}
60	5.5×10^{5}	8.5×10^{5}	1.9×10^{4}	2.5×10^{5}	3.0×10^{4}	3.2×10^{4}
72	NF	2.5×10^{5}	NF	2.0×10^{5}	NF	NF
84	NF	NF	NF	NF	NF	NF

หมายเหตุ NF :- Not Found ตรวจไม่พบการเจริญ เนื่องจากมีโคโลนีของ *Bacillus* spp. เจริญปกคลุมอยู่

ฐิติพงษ์ ธนะรัชติการนนท์ พบว่าปริมาณเซลล์สดของ *Lactobacillus* spp. ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) 10^6 CFU/ml และให้ทุก 3 วัน เป็นปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับป้อนให้ไก่ เนื่องจากให้จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดในลำไส้ไก่อยู่ในระดับที่สูงพอสมควร (10^7 CFU/g ที่ 19 วันของการเลี้ยง) และมีการเว้นช่วงระยะเวลาการให้ที่พอเหมาะสามารถนำไปใช้จริงในงานภาคสนามได้กอปรกับจากการศึกษาในงานวิจัยนี้ (ตารางที่ 2-5) ทำให้สรุปได้ว่า *Lactobacillus* spp. เตรียมในรูปผงแห้งแบบผสม ผสมในน้ำดื่มและในอาหารไก่ มีการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* spp. 4 สายพันธุ์ หลังการเก็บที่ -20^0 ซ นาน 1 ปี มีค่าสูงกว่าร้อยละ 90 และผลการตรวจสอบอาหารไก่สำเร็จรูปของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ (มหาชน) จำกัด ไม่มีการปนเปื้อนจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียอื่น ๆ ในอาหารไก่ และเมื่อนำไปผสมในน้ำกรองและอาหารไก่สำเร็จรูป สามารถมีชีวิตอยู่รอดและเพิ่มจำนวนในน้ำกรองได้นานกว่า 3 วัน ในขณะที่ในอาหารไก่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้นานกว่า 2 วัน ด้วยช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับให้ไก่กินอยู่ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการเติม (10^6 CFU/g) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำผลดังกล่าวไปทดสอบใช้จริงในภาคสนามต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การทดสอบภาคสนามเพื่อตรวจสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ต่อการเจริญเติบโตของไก่

ผลการเปรียบเทียบการให้ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมในน้ำดื่มและในอาหารไก่แสดงดังตารางที่ 6 ในช่วง 19 วันของการเลี้ยง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมไม่ให้โพรไบโอติก ไก่กลุ่มที่ 2 ซึ่งให้อาหารผสมสารปฏิชีวนะพร้อมผสมโพรไบโอติกมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุดและสูงกว่ากลุ่มควบคุมยกเว้นไก่กลุ่มที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองอื่นๆ พบว่าทุกกลุ่มทดลองให้น้ำหนักเฉลี่ยที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมยกเว้นไก่กลุ่มที่ 2 และเมื่อพิจารณาถึงค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารเฉลี่ย พบว่าทุกกลุ่มทดลองให้ค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุม ผลการทดลองในช่วง 42 วัน พบว่า ไก่กลุ่มที่ 5 ซึ่งให้อาหารสูตรไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มสูงสุด รองลงมา ได้แก่ ไก่กลุ่มที่ 2 ซึ่งให้อาหารสูตรผสมสารปฏิชีวนะพร้อมผสมโพรไบโอติก ทั้ง 2 กลุ่มทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุม สำหรับไก่กลุ่มอื่นๆ พบว่าให้น้ำหนักเฉลี่ยที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม เรียงตามลำดับ ได้แก่ ไก่กลุ่มที่ 4 ให้อาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะพร้อมผสมโพรไบโอติก และไก่กลุ่มที่ 3 ให้อาหารผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม พิจารณาค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารเฉลี่ยพบว่าทุกกลุ่มทดลองมีค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุม ยกเว้นไก่กลุ่มที่ 5 ให้อาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม

เมื่อพิจารณาผลของน้ำหนักเฉลี่ยทุกช่วงอายุการเลี้ยงในไก่แต่ละกลุ่มทดลอง ผลการทดสอบทางสถิติ (Duncan multiple range test) พบว่า ไก่กลุ่มที่ 2 และไก่กลุ่มที่ 5 มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุม สำหรับไก่กลุ่มที่ 4 และ 3 มีค่าน้ำหนักเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ตามลำดับ ผลการทดสอบที่ได้ในไก่ทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารเฉลี่ยตลอดทุกช่วงอายุการเลี้ยง ผลการทดสอบทางสถิติพบว่าไก่กลุ่มที่ 5 และกลุ่มควบคุมมีค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับไก่กลุ่มที่ 3 โดยไก่กลุ่มที่ 2 และ 4 มีค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารสูงสุด และสูงกว่าไก่กลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และในทุกกลุ่มทดลองเมื่อพิจารณาถึงอัตราการตาย พบว่าอยู่ในช่วงร้อยละ 3.13 - 5.21 ซึ่งถือว่าอยู่ในเกณฑ์ปรกติ

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ย ประสิทธิภาพการใช้อาหารเฉลี่ย และอัตราการตายระหว่างไก่กลุ่มทดลองให้ และไม่ให้โพรไบโอติก เมื่อครบการเลี้ยง 42 วัน

กลุ่ม	อายุ 19 วัน			อายุ 42 วัน			
	น้ำหนัก		ประสิทธิภาพ	น้ำหนัก		ประสิทธิภาพ	อัตรา
	เฉลี่ย (กรัม)	%ความสัมพันธ์น้ำหนักเฉลี่ยเพิ่ม[1]	การใช้อาหารเฉลี่ย	เฉลี่ย (กรัม)	%ความสัมพันธ์น้ำหนักเฉลี่ยเพิ่ม[1]	การใช้อาหารเฉลี่ย	การตาย (%)
1	601.01 ± 28.55	-	1.22 ± 0.11	1,888.81[a] ± 82.34	-	1.40[a] ± 0.13	0
2	605.56 ± 25.98	0.81	1.30 ± 0.05	1,906.15[a] ± 88.87	0.93	1.60[ab] ± 0.17	4.16
3	596.52 ± 24.81	-0.80	1.32 ± 0.09	1,865.40[a] ± 44.37	-1.27	1.43[b] ± 0.18	5.20
4	592.50 ± 13.18	-1.50	1.29 ± 0.05	1,873.22[a] ± 86.75	-0.84	1.55[ab] ± 0.08	3.13
5	594.29 ± 24.30	-1.18	1.24 ± 0.06	1,913.09[a] ± 90.34	1.32	1.39[a] ± 0.11	5.20

หมายเหตุ [1] เปรียบเทียบกับน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มของ กลุ่มควบคุม, คิดน้ำหนักเฉลี่ยไก่อายุ 1 วัน เท่ากับ 39.2 กรัม เท่ากันทุกกลุ่ม

กลุ่ม 1 กลุ่มควบคุมให้อาหารสูตรผสมสารปฏิชีวนะ, กลุ่ม 2 ให้อาหารสูตรผสมสารปฏิชีวนะพร้อมผสมโพรไบโอติก, กลุ่ม 3 ให้อาหารสูตรผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม, กลุ่ม 4 ให้อาหารสูตรไม่ผสมสารปฏิชีวนะพร้อมผสมโพรไบโอติก, กลุ่ม 5 ให้อาหารสูตรไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม, [a, b, ab] ตัวอักษรชุดต่างกัน หมายถึง ค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$)

สามารสรุปผลจากการทดลองได้ว่า การเสริมโพรไบโอติกลงในอาหารร่วมกับสารปฏิชีวนะให้ไก่กิน และการเสริมโพรไบโอติกลงในน้ำดื่มโดยไก่ไม่ได้รับสารปฏิชีวนะให้น้ำหนักเฉลี่ยสูงกว่าไก่กลุ่มที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกเลย โดยในไก่เล็ก (อายุ 1 - 19 วัน) การเสริมโพรไบโอติกลงในอาหารร่วมกับสารปฏิชีวนะจะให้ผลดีกว่าการเสริมโพรไบโอติกลงในน้ำดื่มให้ไก่เพียงอย่างเดียวขณะที่การเสริมโพรไบโอติกลงในน้ำดื่มให้ไก่เพียงอย่างเดียว จะให้ผลดีกว่าในไก่รุ่นหรือไก่กระทง (อายุ 19 - 42 วัน) เมื่อพิจารณาผลของน้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 42 วัน และค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารเฉลี่ยประกอบกัน พบว่าไก่กลุ่มที่เสริมโพรไบโอติกลงในน้ำดื่มโดยไก่ไม่ได้รับสารปฏิชีวนะเลยให้ผลดีที่สุด จึงสรุปเบื้องต้นได้ว่า การใช้โพรไบโอติกเสริมลงในน้ำดื่มให้ไก่สามารถทดแทนการเสริมสารปฏิชีวนะลงในอาหารสัตว์ได้ โดยไก่จะมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงใกล้เคียงกับไก่ที่ได้รับสารปฏิชีวนะจากอาหาร แต่จะมีน้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการทดลองสูงกว่า และมีค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารใกล้เคียงกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19046490

เปรียบเทียบผลการตรวจนับจำนวน ล.อ.บ. ในลำไส้ไก่อายุ 1 ,18 , 27, 36 และ 42 วัน ดังตารางที่ 7 ในไก่ทุกกลุ่มทดลอง พบว่าในไก่กลุ่มที่ 5 ให้อาหารสูตรไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม มีจำนวน ล.อ.บ. ที่ตรวจพบสูงสุดกว่ากลุ่มทดลองอื่นๆ ในทุกช่วงอายุ (10^6 - 10^7 CFU/g) ยกเว้นในวันที่ 36 ของการเลี้ยง รองลงมา ได้แก่ ไก่กลุ่มที่ 2 ให้อาหารผสมสารปฏิชีวนะพร้อมผสมโพรไบโอติก (10^5 - 10^7 CFU/g) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างไก่กลุ่มทดลองทั้ง 2 ไก่กลุ่มที่ 5 มีความสม่ำเสมอของปริมาณเซลล์ที่พบมากกว่ากลุ่มที่ 2 และเมื่อเปรียบเทียบกับไก่กลุ่มที่ 3 และ 4 พบว่าไก่กลุ่มที่ 3 ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม และไก่กลุ่มที่ 4 ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะพร้อมผสมโพรไบโอติกมีจำนวนเซลล์ที่พบตลอดการทดลองต่ำกว่าและมีความสม่ำเสมอของจำนวนเซลล์ที่ตรวจพบต่ำกว่าทั้ง 2 กลุ่มทดลองข้างต้น เมื่อเปรียบเทียบกับไก่กลุ่มควบคุมไม่ได้เติมโพรไบโอติก พบว่าแบบแผนของจำนวน ล.อ.บ. ที่พบในลำไส้ต่างกัน กล่าวคือ ในไก่กลุ่มควบคุมในช่วงแรกของการเลี้ยงพบ ล.อ.บ. ต่ำมาก (10^2 CFU/g) จำนวนที่พบจะเพิ่มขึ้นในช่วงหลังของการเลี้ยง (ที่ 18 วัน พบ 10^5 CFU/g) และมีจำนวนสูงสุดในวันที่ 36 และ 42 ตามลำดับ (10^6 CFU/g) ในไก่กลุ่มทดลองอื่นแบบแผนจำนวน ล.อ.บ. ที่ตรวจพบต่างกัน โดยในกลุ่มที่ 2 ได้รับสารปฏิชีวนะในอาหารและผสมโพรไบโอติก และกลุ่มที่ 4 ได้รับอาหารที่ไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในอาหาร ตรวจพบจำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 9 ของการเลี้ยง และจำนวนที่พบลดต่ำลงตามช่วงอายุ ($10^7 \rightarrow 10^5$ CFU/g) สำหรับไก่กลุ่มที่ 3 และ 5 ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและเสริมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม และได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและเสริมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม จำนวน ล.อ.บ. ที่พบเพิ่มสูงขึ้นจากวันแรกของการเลี้ยงจนสูงสุดในวันที่ 36 และ 27 ของการเลี้ยง จากนั้นเริ่มลดลงแต่ยังมีปริมาณสูง ($10^7 \rightarrow 10^5$ และ $10^7 \rightarrow 10^6$ CFU/g ตามลำดับ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 Total viable count ของแบคทีเรียประจำถิ่น และ *Lactobacillus spp.* ในลำไส้เล็กไก่อายุ 1-42 วัน

กลุ่ม	จำนวนแบคทีเรีย	จำนวนแบคทีเรียที่ตรวจพบ (CFU/g)					
		1 วัน	9 วัน	18 วัน	27 วัน	36 วัน	42 วัน
1	แบคทีเรียประจำถิ่น	1.56×10^{5}	1.0×10^{10}	7.95×10^{9}	4.08×10^{11}	2.18×10^{9}	8.61×10^{8}
	แลคติกแอซิดแบคทีเรีย	1.87×10^{2}	8.1×10^{4}	8.0×10^{5}	4.23×10^{5}	1.67×10^{6}	1.43×10^{6}
2	แบคทีเรียประจำถิ่น	- *	7.87×10^{7}	8.75×10^{8}	5.0×10^{10}	6.0×10^{7}	5.02×10^{7}
	แลคติกแอซิดแบคทีเรีย	- *	**4.63×10^{7}**	8.0×10^{5}	6.0×10^{5}	1.72×10^{6}	7.2×10^{5}
3	แบคทีเรียประจำถิ่น	- *	8.5×10^{6}	8.76×10^{9}	3.35×10^{10}	1.71×10^{8}	3.93×10^{7}
	แลคติกแอซิดแบคทีเรีย	- *	6.42×10^{6}	6.95×10^{5}	5.0×10^{4}	**1.58×10^{7}**	1.08×10^{5}
4	แบคทีเรียประจำถิ่น	- *	1.03×10^{8}	1.22×10^{9}	2.62×10^{10}	2.43×10^{8}	4.63×10^{7}
	แลคติกแอซิดแบคทีเรีย	- *	1.69×10^{7}	3.7×10^{5}	4.5×10^{4}	1.9×10^{6}	1.73×10^{5}
5	แบคทีเรียประจำถิ่น	- *	4.62×10^{7}	2.46×10^{9}	1.2×10^{9}	2.91×10^{9}	5.10×10^{7}
	แลคติกแอซิดแบคทีเรีย	- *	**4.52×10^{7}**	**7.8×10^{6}**	**8.0×10^{7}**	1.57×10^{6}	**1.61×10^{6}**

หมายเหตุ * ไม่ได้ทดสอบ เนื่องจากใช้จำนวนแบคทีเรียในไก่กลุ่มควบคุม เป็นตัวแทนของไก่กลุ่มทดลองทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างลำไส้ไก่ทั้ง 3 ตัวอย่างมีค่าอยู่ระหว่าง 1.12-1.93 x 10^{5} CFU/g และจำนวนแลคติกแอซิดแบคทีเรียมีค่าอยู่ระหว่าง 1.0- 2.6 x 10^{2} CFU/g, กลุ่ม 1 คือ กลุ่มควบคุมให้อาหารผสมสารปฏิชีวนะ, กลุ่ม 2 ให้อาหารผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติก, กลุ่ม 3 ให้อาหารผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม, กลุ่ม 4 ให้อาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติก, กลุ่ม 5 ให้อาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม

ผลของน้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 42 วัน และผลของ ล.อ.บ. ในลำไส้ พบว่าสอดคล้องกัน กล่าวคือ กลุ่มที่มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุดเป็นกลุ่มที่ตรวจพบจำนวน ล.อ.บ. สูงสุดตลอดทุกช่วงอายุ ได้แก่ ไก่กลุ่มที่ 5 ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและเสริมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม และไก่กลุ่มที่ 2 ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะพร้อมทั้งเสริมโพรไบโอติก ตามลำดับ โดยไก่ทั้ง 2 กลุ่มมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งมีจำนวน ล.อ.บ. ในลำไส้ต่ำกว่าต่อตระยะเวลาการเลี้ยง สำหรับไก่กลุ่มที่ 3 ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะพร้อมทั้งเสริมโพรไบโอติกในน้ำดื่มและไก่กลุ่มที่ 4 ให้อาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่มควบคุม พบมีจำนวน ล.อ.บ. ตลอดการทดลองต่ำกว่าไก่กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 5 และต่ำกว่าไก่กลุ่มควบคุมไม่ได้รับโพรไบโอติก จากผลการทดลองข้างต้น แสดงว่าการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเฉลี่ยมีความสัมพันธ์กับปริมาณ ล.อ.บ. ที่เพิ่มขึ้นรวมทั้งเกี่ยวข้องกับความสม่ำเสมอของจำนวน ล.อ.บ. ที่พบ โดยแสดงถึงความเสถียรของ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติกที่ให้

เมื่อพิจารณาถึงจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นทั้งหมดในลำไส้ไก่ช่วงอายุ 9 วันในไก่กลุ่มทดลองจำนวน ล.อ.บ. ที่พบใกล้เคียงกับจำนวน ล.อ.บ. ที่ให้ในอาหารและในน้ำดื่มผลดังตารางที่ 4,5 และ 7 แสดงว่า ล.อ.บ. ที่เสริมให้ในอาหารและในน้ำดื่มสามารถเข้าไปเจริญเพิ่มจำนวนและเข้าไปแทนที่แบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้เล็กในช่วงแรกของการเลี้ยงได้ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่น และจำนวน ล.อ.บ. ตลอดอายุการเลี้ยงในไก่ทุกกลุ่มทดลอง พบว่า เมื่อจำนวน ล.อ.บ. ในลำไส้เพิ่มขึ้นจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นจะเพิ่มขึ้นตาม แต่เมื่อจำนวน ล.อ.บ. ในลำไส้ลดลงจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นกลับเพิ่มสูงขึ้น แสดงว่า ล.อ.บ. มีส่วนเข้าไปควบคุมสมดุลย์ของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารไก่ เมื่อพิจารณาในไก่แต่ละกลุ่มทดลอง พบว่าไก่กลุ่มที่ 5 ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่มมีจำนวน ล.อ.บ. ที่พบใกล้เคียงกับแบคทีเรียประจำถิ่นมากที่สุดในไก่กลุ่มทดลองทั้งหมด แสดงว่า *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติกที่ให้สามารถเข้าไปเจริญเพิ่มจำนวนและแทนที่แบคทีเรียประจำถิ่นส่วนใหญ่ในลำไส้ได้ และที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการทดลองนี้ คือ การนำโพรไบโอติกเสริมลงในน้ำดื่ม

ตรวจสอบความสามารถในการอยู่รอดในลำไส้ไก่ของ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับไก่กลุ่มควบคุมไม่ให้โพรไบโอติก พบว่า *L. acidophilus* TISTR 1338 สามารถอยู่รอดในลำไส้ไก่ได้ดีที่สุด โดยตรวจพบในไก่ทุกกลุ่มทดลอง ทั้งช่วงอายุ 18 และ 42 วัน รองลงมาคือ *L. bulgaricus* TISTR 1339 และ *L. casei* subsp. *tolerans* TISIR 1441 ตามลำดับ สำหรับ *L. jensenii* TISTR 1342 ไม่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกในการทดลองนี้ เนื่องจากตรวจไม่พบในลำไส้ไก่ในทุกช่วงอายุ (ตารางที่ 8)

ผลการจำแนกสายพันธุ์ของ ล.อ.บ. ในลำไส้ไก่เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมไม่ให้โพรไบโอติกและกลุ่มทดลองให้โพรไบโอติก ดังตารางที่ 8 พบว่าในลำไส้ไก่อายุ 1 วัน ตรวจพบสายพันธุ์ของ group-D-Enterococcus และตรวจพบมากขึ้นที่อายุ 18 วัน รวมทั้งเริ่มตรวจพบการเจริญของ *Lactobacillus* spp. และเมื่อครบการเลี้ยง 42 วัน group-D-Enterococcus ในไก่กลุ่มควบคุมเกือบทั้งหมดถูกแทนที่ด้วย *Lactobacillus* spp. เมื่อเปรียบเทียบกับในไก่ทุกกลุ่มทดลองตรวจพบ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติกเข้าเจริญแทนที่ group-D-Enterococcus ในวันที่ 18 ของการเลี้ยงและพบเพิ่มมากขึ้นในวันที่ 42 ของการเลี้ยง โดยไก่กลุ่มที่ 5 ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม พบว่า group-D-Enterococcus ทั้งหมดถูกแทนที่ด้วย *Lactobacillus* spp. และพบมีจำนวน *Lactobacillus* spp. ที่ให้มากที่สุดขาดเพียง *L. jensenii* TISTR 1342 เท่านั้น รองลงมาคือ ไก่กลุ่มที่ 2 ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะพร้อมผสมโพรไบโอติก ตรวจพบ *L. acidophilus* TISTR 1338 และ *L. bulgaricus* TISTR 1339 ในวันที่ 18 และ 42 ของการเลี้ยง ผลการทดลองจากตารางที่ 6 และ 7 แสดงว่า จำนวน ล.อ.บ. ที่เพิ่มมากขึ้นมาจาก *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติกที่เสริมให้ในอาหารและในน้ำดื่ม

สายพันธุ์ที่พบในวันที่ 18 ของการเลี้ยงในไก่ทุกกลุ่ม พบ group-D-Enterococcus เพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในไก่กลุ่มควบคุมไม่ให้โพรไบโอติก คาดว่าอาจเกิดการปนเปื้อนจากแหล่งอื่น ทำการตรวจสอบซ้ำโดยนำอาหารไก่สำเร็จรูปผสมสารปฏิชีวนะสูตร CB-I-852, CB-II-852 และ CB-I-853, CB-II-853 สูตรไม่ผสมสารปฏิชีวนะของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ มหาชน จำกัด เพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแลคโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส บ่มที่ 37°ซ 24 ชั่วโมง ทำ serial dilution ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเอ็ม อาร์ เอส ก่อนทำ spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอ็ม อาร์ เอส บ่มใน candle jar ที่ 37°ซ นาน 48 ชั่วโมง ผลดังตารางที่ 9 พบมีการปนเปื้อนของ group-D-Enterococcus ซึ่งตรงกับสายพันธุ์ที่พบในลำไส้ไก่อายุ 18 วันในอาหารไก่ซึ่งได้แก่ *E. faecium*, *E. bovis variant* และ *E. durans* และ ในอาหารสูตร CB-I-853 และ CB-II-853 พบ *Pendiococcus* spp. เพิ่มเข้ามา จึงเป็นไปได้ว่า ล.อ.บ. ที่ปนเปื้อนในอาหารไก่เข้ามามีผลรบกวนการทดลอง โดยไปเพิ่มจำนวน ล.อ.บ. ในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุมและรบกวนการเจริญของ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติกที่ให้ในไก่กลุ่มทดลองส่งผลต่ออัตราการเจริญของไก่ทำให้ผลของน้ำหนักเฉลี่ยในไก่กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

ตารางที่ 8 สายพันธุ์แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ตรวจพบในลำไส้เล็กไก่ อายุ 1, 18 และ 42 วัน

กลุ่ม	สายพันธุ์แลคติกแอซิดแบคทีเรียในลำไส้ไก่		
	อายุ 1 วัน	อายุ 18 วัน	อายุ 42 วัน
1	*Enterococcus faecalis*	*Enterococcus faecalis* *E. faecium* *E. durans* *E. bovis variant* *L. fermentum* *L. salivarius*	*E. faecalis* *E. faecium* *L. fermentum* *L. plantarum* *L. salivarius* *L. delbrecukii*
2	-*	*E. faecalis* *E. faecium* ***L. acidophilus*** TISTR 1338	*E. faecalis* ***L. acidophilus*** TISTR 1338 ***L. bulgaricus*** TISTR 1339 *L. fermentum* *L. delbreuckii*
3	-*	*E. faecium* *E. bovis variant* ***L. acidophilus*** TISTR 1338 *L. salivarius*	*E. faecalis* ***L. acidophilus*** TISTR 1338 *L. salivarius* *L. plantarum*
4	-*	*E. faecalis* *E. faecium* *E. durans* *E. bovis variant* ***L. acidophilus*** TISTR 1338	*E. faecalis* *E. durans* ***L. acidophilus*** TISTR 1338 *L. delbreuckii* *L. salivarius*
5	-*	*E. durans* *E. bovis variant* ***L. acidophilus*** TISTR 1338	***L. acidophilus*** TISTR 1338 ***L. bulgaricus*** TISTR 1339 ***L. casei*** subsp. ***tolerans*** TISTR 1341 *L. fermentum* *L. salivarius*

หมายเหตุ * ไม่ได้ทดสอบ เนื่องจากใช้จำนวน จ.อ.บ. ในไก่กลุ่มควบคุมเป็นตัวแทนของไก่กลุ่มทดลองทั้งหมด กลุ่ม 1 คือ กลุ่มควบคุมให้อาหารผสมสารปฏิชีวนะ กลุ่ม 2 ให้อาหารผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติก กลุ่ม 3 ให้อาหารผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม กลุ่ม 4 ให้อาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติก กลุ่ม 5 ให้อาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม

ตารางที่ 9 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด แลคติกแอซิดแบคทีเรีย และสายพันธุ์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารไก่สำเร็จรูปของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ มหาชน จำกัด

อาหารไก่	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (CFU/g)[1]	จำนวนแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (CFU/g)[2]	สายพันธุ์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย
CB-I-852 (ผสมสารปฏิชีวนะ)	6.45×10^9	3.68×10^8	*Enterococcus faecium* *E. durans* *E. bovis variant*
CB-II-852 (ผสมสารปฏิชีวนะ)	3.18×10^9	2.46×10^8	*E. faecium* *E. durans* *E. bovis variant*
CB-I-853 (ไม่ผสมสารปฏิชีวนะ)	4.12×10^9	2.49×10^8	*E. faecium* *E. durans* *E. bovis variant* *Pediococcus spp.*
CB-II-853 (ไม่ผสมสารปฏิชีวนะ)	1.8×10^9	3.1×10^8	*E. faecium* *E. durans* *E. bovis variant* *Pediococcus spp.*

หมายเหตุ

[1] ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหารแข็งทริปติกซอย บ่มที่ 37 ^{0}ซ นาน 18-24 ชั่วโมง

[2] ตรวจหาจำนวนแลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลี้ยงเชื้อเหลว เอ็ม อาร์ เอส นาน 24 ชั่วโมง และตรวจนับจำนวนแลคติกแอซิดแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยง เชื้อแข็ง เอ็ม อาร์ เอส ผสมบรอมเครซอลเพอเพิล บ่มที่ 37^{0}ซ ใน candle jar นาน 48 ชั่วโมง

4. การทดสอบภาคสนามเพื่อตรวจสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S.* Typhimurium ในไก่พันธุ์เนื้อของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ มหาชน จำกัด

ทดสอบความสามารถในการต้านทางการติดเชื้อ *S.* Typhimurium ของ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติก โดยการป้อน *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ได้รับเอื้อเพื้อจากคณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ให้ไก่แรกเกิดอายุ 1 วัน ขนาด 10^3 CFU/g ซึ่งเป็นขนาด LD_{50} ในหนูขาว (Brownell, 1969) ตามด้วยการเสริมโพรไบโอติกในอาหารไก่และในน้ำดื่ม ขนาด 10^6 CFU/g และ CFU/ml ให้ไก่ตั้งแต่อายุ 1 วันและให้ซ้ำทุก 3 วัน ตรวจสอบอัตราการตายและอาการของโรค ผลการทดลองในช่วง 10 วันแรกตรวจพบไก่มีอาการท้องเสียอุจจาระเหลว แฉะติดกัน เซื่องซึมกินอาหารได้น้อย แต่ความรุนแรงของอาการที่ปรากฏแตกต่างกันในไก่แต่ละกลุ่มไม่สามารถเปรียบเทียบได้อย่างชัดเจนว่าไก่กลุ่มใดมีอาการของโรคพาราไทฟอยด์ที่เกิดจาก *S.* Typhimurium สายพันธุ์ที่ให้จึงป้อนซ้ำ ขนาด 10^6 CFU/g เมื่ออายุ 12 วัน ผลที่ได้เช่นเดียวกับช่วง 10 วัน จึงป้อนซ้ำครั้งที่ 3 เมื่ออายุ 21 วันโดยใช้สายพันธุ์ที่แยกจากผู้ป่วยที่มีอาการของโรค enteric fevers ได้รับเอื้อเพื้อจากคณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ขนาด 10^8 CFU/g ผลที่ได้ยังคงมองไม่เห็นความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมให้และไม่ให้ *S.* Typhimurium ของไก่แต่ละกลุ่มโดยใช้อัตราการตายและอาการของโรคเป็นตัวเปรียบเทียบได้ จึงทำการเปรียบเทียบการต้านทานการติดเชื้อ *S.* Typhimurium โดยใช้ปริมาณ *S.* Typhimurium ที่ตรวจพบในลำไส้ไก่แต่ละกลุ่มทดลอง

ผลการตรวจสอบปริมาณ *S.* Typhimurium ในลำไส้ไก่ทั้ง 6 กลุ่ม ดังตารางที่ 10 พบว่าปริมาณ *Salmonella* spp. ตรวจพบช่วงเวลาเดียวกันในไก่กลุ่มควบคุมและไก่กลุ่มทดลองให้ *S.* Typhimurium แตกต่างอย่างไม่ชัดเจน พิจารณาผลการให้ *S.* Typhimurium ขนาด 10^8 CFU/g ในวันที่ 21 ของการเลี้ยงจนถึงวันที่ 36 ซึ่งเป็นวันสิ้นสุดการเลี้ยง ไก่กลุ่มที่ 5 ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่มและให้ *S.* Typhimurium มีจำนวน *S.* Typhimurium ลดลงต่ำสุดโดยตรวจไม่พบจำนวน *S.* Typhimurium เลยในวันที่ 36 ($10^8 \rightarrow 10^7 \rightarrow 0$ CFU/g) และไก่กลุ่มที่ 2 ตรวจพบ 10^2 CFU/g 1 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 50 และตรวจไม่พบเลยในอีก 1 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 50 เช่นเดียวกัน ($10^8 \rightarrow 10^6 \rightarrow 10^2, 0$ CFU/g) เปรียบเทียบในไก่กลุ่มควบคุมให้ *S.* Typhimurium และไม่ให้โพรไบโอติก พบว่าไก่กลุ่มควบคุมมีจำนวน *Salmonella* spp. ลดลงเช่นเดียวกัน แต่ลดลงในอัตราที่ต่ำกว่าไก่กลุ่มที่ 5 และกลุ่มที่ 2 ตามลำดับ โดยในไก่กลุ่มที่ 1 ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและให้ *S.* Typhimurium ลดลง $10^8 \rightarrow$

$10^7 \rightarrow 10^2$, 0 CFU/g) และไก่กลุ่มที่ 4 ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและให้ S. Typhimurium ลดลง $10^8 \rightarrow 10^7 \rightarrow 10^2$ CFU/g)

จำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ตลอดการเลี้ยง ดังตารางที่ 10 พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันในไก่แต่ละกลุ่มทดลอง ($10^3 \rightarrow 10^8$ CFU/g) รวมทั้งไก่กลุ่มควบคุม ($10^3 \rightarrow 10^9$ CFU/g) ผลการตรวจหาจำนวน ล.อ.บ. ในลำไส้ เปรียบเทียบเฉพาะกลุ่มที่ให้สารปฏิชีวนะในอาหารเช่นเดียวกัน พบว่าจำนวน ล.อ.บ. พบที่ช่วงเวลาเดียวกันและตลอดการทดลองไม่แตกต่างกันมากนักทั้งในกลุ่มให้และไม่ให้โพรไบโอติก ($10^2 \rightarrow 10^7$ CFU/g และ $10^2 \rightarrow 10^7$ CFU/g ตามลำดับ) เช่นเดียวกับกลุ่มที่ให้โพรไบโอติกในน้ำดื่ม จากตารางที่ 11 ในไก่กลุ่มควบคุมอายุ 18 วัน ตรวจพบการเจริญของ *L. fermentum* และ *L. delbreuckii* ร่วมกับ group-D-Enterococcus และเมื่อครบการเลี้ยง 36 วัน group-D-Enterococcus ทั้งหมดถูกแทนที่ด้วย *Lactobacillus* spp. ทั้งหมด โดยมีสายพันธุ์ที่พบเพิ่มขึ้น คือ *L. plantarum* และ *L. salivarius*

ตรวจพบ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติกในลำไส้ไก่กลุ่มทดลองให้โพรไบโอติกพร้อมกับตรวจพบ ล.อ.บ. ประจำถิ่นในลำไส้ด้วย แสดงว่า ล.อ.บ. สายพันธุ์โพรไบโอติกมีความเข้ากันได้กับแหล่งที่อยู่ในลำไส้ และเข้าไปเจริญอยู่ร่วมกับ ล.อ.บ. ประจำถิ่นในลำไส้ได้ โดย *L. acidophilus* TISTR 1338 เป็นสายพันธุ์ที่ตรวจพบมากที่สุดโดยพบที่อายุ 18 และ 36 วัน ในไก่กลุ่มที่ 2 ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกและไก่กลุ่มที่ 5 ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะ และผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม ไก่ทั้ง 2 กลุ่มทดลองได้รับ *S.* Typhimurium เช่นเดียวกัน ที่พบรองลงมา คือ *L. bulgaricus* TISTR 1339 โดยพบที่ 36 วันของการเลี้ยงในไก่กลุ่มที่ 2 และ 5 เช่นเดียวกัน สำหรับ *L. casei* subsp. *tolerans* TISTR 1341 และ *L. jensenii* TISTR 1342 ตรวจไม่พบในลำไส้ไก่ทั้ง 2 กลุ่ม

สำหรับไก่กลุ่มที่3 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและโพรไบโอติกตรวจพบ *L. acidophilus* TISTR 1338 และ *L. bulgaricus* TISTR 1339 และไก่กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มควบคุมได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่มตรวจพบ *L. acidophilus* TISTR 1338 , *L. bulgaricus* TISTR 1339 และ *L. casei* subsp. *tolerans* TISTR 1342 ในลำไส้ไก่อายุ 36 วันเป็นการยืนยันผลการทดลองในข้อ 3 *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติกที่ให้สามารถเข้าแข่งขันและเจริญเพิ่มจำนวนรวมทั้งเข้าไปแทนที่แบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ไก่ได้ และให้ผลในการเร่งการเจริญของสัตว์ได้ โดยการให้โพรไบโอติกเสริมในน้ำดื่มให้ผลดีกว่าการเสริมในอาหารร่วมกับสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 10 Total viable count ของแบคทีเรียประจำถิ่น แลคติกแอซิดแบคทีเรีย และ *Salmonella* spp. ในลำไส้เล็กไก่พันธุ์เนื้ออายุ 1-36 วัน

กลุ่ม	ชนิดแบคทีเรีย	Total viable count (CFU/g)				
		1 วัน	9 วัน	18 วัน	27 วัน	36 วัน
1	แบคทีเรียประจำถิ่น	-*	1.6×10^9	1.9×10^8	1.8×10^6	1.6×10^6
	แลคติกแอซิดแบคทีเรีย	-*	2.3×10^5	4.1×10^6	6.1×10^5	7.2×10^6
	S. Typhimurium	-*	1.0×10^3	1.0×10^6	2.6×10^8	1.3×10^2
2	แบคทีเรียประจำถิ่น	-*	1.5×10^8	8.5×10^8	2.8×10^7	1.2×10^6
	แลคติกแอซิดแบคทีเรีย	-*	3.2×10^6	5.4×10^6	7.1×10^6	1.6×10^7
	S. Typhimurium	-*	1.0×10^3	7.0×10^5	1.1×10^6	1.0×10^2 NF
3	แบคทีเรียประจำถิ่น	8.5×10^3	6.5×10^7	1.4×10^8	3.3×10^5	1.6×10^7
	แลคติกแอซิดแบคทีเรีย	3.2×10^2	3.5×10^7	1.2×10^7	3.1×10^6	1.8×10^7
	S. Typhimurium	NF	NF	NF	NF	NF
4	แบคทีเรียประจำถิ่น	-*	3.0×10^8	4.3×10^7	3.0×10^5	2.0×10^6
	แลคติกแอซิดแบคทีเรีย	-*	4.8×10^5	6.7×10^6	7.1×10^4	2.0×10^6
	S. Typhimurium	-*	1.2×10^3	1.3×10^6	3.0×10^7	3.5×10^2
5	แบคทีเรียประจำถิ่น	-*	9.9×10^7	1.8×10^8	7.9×10^6	3.5×10^5
	แลคติกแอซิดแบคทีเรีย	-*	3.8×10^6	2.8×10^7	1.4×10^7	4.3×10^6
	S. Typhimurium	-*	1.8×10^3	1.0×10^5	1.2×10^7	NF
6	แบคทีเรียประจำถิ่น	9.3×10^3	1.3×10^8	2.8×10^6	2.2×10^6	8.1×10^6
	แลคติกแอซิดแบคทีเรีย	1.8×10^2	4.7×10^6	1.9×10^6	2.0×10^7	4.2×10^7
	S. Typhimurium	NF	NF	NF	NF	NF

หมายเหตุ * ไม่ได้ทดสอบ เนื่องจากใช้จำนวนแบคทีเรียในไก่กลุ่มควบคุมเป็นตัวแทนของไก่กลุ่มทดลองทั้งหมด ในไก่กลุ่มควบคุมที่ 3 มีจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นอยู่ในช่วง $7.8\text{-}9.2 \times 10^3$ CFU/g และจำนวน ล.อ.บ. อยู่ในช่วง $2.1\text{-}4.3 \times 10^2$ CFU/g ในไก่กลุ่มควบคุมที่ 6 มีจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นอยู่ในช่วง $8.8 - 9.8 \times 10^3$ CFU/g และจำนวน ล.อ.บ. อยู่ในช่วง $1.2\text{-}2.4 \times 10^2$ CFU/g, ให้ S. Typhimurium จำนวน 3 ครั้ง คือ ไก่อายุ 1 วัน ให้ 10^3 CFU/g อายุ 12 วันให้ 10^6 CFU/g และอายุ 21 วัน ให้ 10^8 CFU/g, NF :- Not Found : ตรวจไม่พบ, กลุ่ม 1 ให้อาหารผสมสารปฏิชีวนะ + *S.* Typhimurium, กลุ่ม 2 ให้อาหารผสมสารปฏิชีวนะและโพรไบโอติก + *S.* Typhimurium, กลุ่ม 3 คือ ให้อาหารผสมสารปฏิชีวนะและโพรไบโอติก, กลุ่ม 4 คือ กลุ่มควบคุมให้อาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะ + *S.* Typhimurium, กลุ่ม 5 ให้อาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม + *S.* Typhimurium, กลุ่ม 6 คือ กลุ่มควบคุมให้อาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม

ตารางที่ 11 สายพันธุ์แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ตรวจพบในลำไส้เล็กไก่พันธุ์เนื้ออายุ 1, 18 และ 36 วัน ในการต้านทานการติดเชื้อ *S.* Typhimurium

กลุ่ม	สายพันธุ์แลคติกแอซิดแบคทีเรียในลำไส้ไก่		
	อายุ 1 วัน	อายุ 18 วัน	อายุ 36 วัน
1	*Enterococcus faecalis* *Pediococcus spp.*	*Enterococcus faecalis* *E. faecium* *E. durans* *L. fermentum* *L. delbreuckii*	*L. fermentum* *L. plantarum* *L. salivarius* *L. delbreuckii*
2	-*	*E. faecalis* *E. faecium* *L. acidophilus* TISTR 1338 *L. fermentum*	*L. acidophilus* TISTR 1338 *L. bulgaricus* TISTR 1339 *L. fermentum* *L. salivarius*
3	-*	*E. faecalis* *E. durans* *L. acidophilus* TISTR 1338 *L. bulgaricus* TISTR 1339	*L. acidophilus* TISTR 1338 *L. bulgaricus* TISTR 1339 *L. fermentum* *L. delbreuckii*
4	-*	*E. faecalis* *E. durans* *L. plantarum*	*L. acidophilus* TISTR 1338 *L. plantarum* *L. salivarius*
5	-*	*E. faecalis* *E. durans* *L. acidophilus* TISTR 1338	*L. acidophilus* TISTR 1338 *L. bulgaricus* TISTR 1339 *L. fermentum* *L. plantarum*
6		*E. durans* *L. acidophilus* TISTR 1338 *L. fermentum* *L. plantarum*	*L. acidophilus* TISTR 1338 *L. bulgaricus* TISTR 1339 *L. casei* subsp. *tolerans* TISTR 1341 *L. fermentum* *L. delbreuckii*

หมายเหตุ * ไม่ได้ทดสอบ เนื่องจากใช้จำนวน ล.อ.บ. ในไก่กลุ่มควบคุมเป็นตัวแทนของไก่กลุ่มทดลองทั้งหมด กลุ่ม 1 คือ กลุ่มควบคุมให้อาหารผสมสารปฏิชีวนะ+ *S.* Typhimurium กลุ่ม 2 ให้อาหารผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติก + *S.* Typhimurium กลุ่ม 3 ให้อาหารผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม กลุ่ม 4 ให้อาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติก + *S.* Typhimurium กลุ่ม 5 ให้อาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม + *S.* Typhimurium กลุ่ม 6 คือ กลุ่มให้อาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม

เปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 36 วัน ดังตารางที่ 12 โดยให้ไก่กลุ่มที่ 4 ให้อาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและให้ S. Typhimurium เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าไก่กลุ่มที่ 1 ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและให้ S. Typhimurium ให้ผลของน้ำหนักเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ผลน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุดในกลุ่มได้รับ S. Typhimurium ได้แก่ ไก่กลุ่มที่ 2 ได้รับสารปฏิชีวนะในอาหารและเสริมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม และที่ให้น้ำหนักเฉลี่ยต่ำสุดในการทดลองนี้ได้แก่ กลุ่มได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม ผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับผลของจำนวน *Salmonella spp.* ตรวจพบในลำไส้ไก่ ซึ่งมีจำนวนใกล้เคียงกันในแต่ละกลุ่มทดลอง โดยกลุ่มที่ 5 ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะ และเสริมโพรไบโอติกในน้ำดื่มเป็นกลุ่มที่ตรวจพบจำนวน S. Typhimurium ต่ำสุด ($10^7 \rightarrow 0$ CFU/g) จึงไม่สามารถสรุปอย่างชัดเจนได้ว่า การใช้ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติกในรูปผงแห้งแบบผสมเสริมในอาหารไก่และในน้ำดื่มสามารถต้านทานการติดเชื้อ S. Typhimurium ได้หรือไม่ เนื่องจากมีหลายปัจจัยเข้ามารบกวนการทดลอง จำเป็นจะต้องทำการทดสอบซ้ำเพื่อยืนยันผลอีกครั้ง

นำผลน้ำหนักเฉลี่ยตลอดทุกช่วงอายุ ทดสอบผลทางสถิติ (Duncan multiple range test) พบว่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในไก่ทุกกลุ่มทดลอง ยกเว้นในไก่กลุ่มควบคุมที่ได้รับโพรไบโอติกแต่ไม่ได้รับ S. Typhimurium สอดคล้องกับค่าประสิทธิภาพการใช้อาหาร อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและโพรไบโอติก และกลุ่มได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม น้ำหนักเฉลี่ยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทั้ง 2 กลุ่มทดลอง ($P<0.05$) เมื่อพิจารณาในไก่ทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าผลการทดลองยืนยันการทดลองในข้อ 3 กล่าวคือ ในช่วง 19 วันแรก ไก่กลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกในอาหารผสมสารปฏิชีวนะมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มสูงกว่าไก่กลุ่มที่ 6 ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม ซึ่งตรงข้ามกับผลการทดลองในช่วง 36 วัน ไก่กลุ่มที่ 6 มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มสูงกว่าไก่กลุ่มที่ 3 จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า การให้โพรไบโอติกในน้ำดื่มมีผลเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตในไก่กลุ่มทดลองในระยะยาวได้ดีกว่าการให้โพรไบโอติกผสมในอาหารไก่ที่มีสารปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามการเสริมโพรไบโอติกให้ไก่ทั้งในลักษณะน้ำดื่มและการผสมโดยตรงในอาหารมีผลเพิ่มน้ำหนักเฉลี่ยได้ดีกว่าการที่ไก่ได้รับสารปฏิชีวนะจากอาหารเพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ย ประสิทธิภาพการใช้อาหารเฉลี่ย และอัตราการตายของไก่ระหว่างกลุ่มที่ให้และไม่ให้โพรไบโอติกในการต้านทานการติดเชื้อ S. Typhimurium ในไก่พันธุ์เนื้อ

กลุ่ม	อายุ 19 วัน		อายุ 36 วัน			อัตรา
	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	ประสิทธิภาพ การใช้อาหาร	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม)	ประสิทธิภาพ การใช้อาหาร	น้ำหนักเฉลี่ยเพิ่ม 19-42 วัน (กรัม)	การตาย (%)
1	566.88 ± 29.75	1.33 ± 0.07	1,439.73 ± 71.64	2.14 ± 0.15	872.86 ± 61.82	1.56
2	562.90 ± 20.68	1.36 ± 0.07	1,471.65 ± 58.00	2.28 ± 0.18	908.75 ± 47.05	0.00
3	621.07 ± 20.64	1.33 ± 0.04	1,497.56 ± 33.54	2.50 ± 0.25	876.49 ± 33.45	9.38
4	548.84 ± 16.90	1.37 ± 0.04	1,426.49 ± 32.98	2.16 ± 0.11	877.65 ± 30.12	6.25
5	547.92 ± 16.79	1.39 ± 0.04	1,420.83 ± 66.99	2.17 ± 0.18	872.92 ± 63.70	4.69
6	605.42 ± 24.17	1.37 ± 0.04	1,505.95 ± 91.69	2.20 ± 0.14	900.63 ± 75.10	7.81

หมายเหตุ คิดน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นอายุ 1 วัน เท่ากับ 43.1 กรัม เท่ากันทุกกลุ่มทดลอง, กลุ่ม 1 คือ กลุ่มควบคุมให้อาหารผสมสารปฏิชีวนะ + S. Typhimurium , กลุ่ม 2 ให้อาหารผสมสารปฏิชีวนะและโพรไบโอติก +S. Typhimurium , กลุ่ม 3 คือ กลุ่มควบคุมให้อาหารผสมสารปฏิชีวนะและโพรไบโอติก, กลุ่ม 4 คือ กลุ่มควบคุมให้อาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะ + S. Typhimurium, กลุ่ม 5 ให้อาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะ และผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม + S. Typhimurium , กลุ่ม 6 คือ กลุ่มควบคุมให้อาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะ และโพรไบโอติกในน้ำดื่ม

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ย ประสิทธิภาพการใช้อาหารเฉลี่ย และอัตราการตายของไก่ระหว่างกลุ่มที่ให้และไม่ให้โพรไบโอติกในการทดสอบยืนยันต้านทานการติดเชื้อ S. Typhimurium ในไก่พันธุ์พื้นบ้านไทย

อายุ	กลุ่ม	น้ำหนัก		ประสิทธิภาพการใช้อาหาร		อัตรา
		เฉลี่ย (กรัม)	% ความสัมพันธ์น้ำหนักเฉลี่ยเพิ่ม[1]	เฉลี่ย	%ความสัมพันธ์น้ำหนักเฉลี่ยเพิ่ม[1]	การตาย (%)
10 วัน	1	76.88 ± 0.88	-	-	-	0
	2	86.88 ± 4.42	25.90	-	-	0
	3	86.25 ± 3.54	24.29	-	-	0
20 วัน	1	206.69 ± 0.63	-	1.94 ± 0.04	-	0
	2	219.86 ± 2.40	7.83	1.90 ± 0.11	+ 2.06	0
	3	219.38 ± 15.03	7.54	1.93 ± 0.09	+ 0.52	0
30 วัน	1	384.29 ± 4.04	-	2.32 ± 0.007	-	0
	2	392.86 ± 16.16	2.48	2.25 ± 0.01	+ 3.02	0
	3	387.86 ± 25.25	1.03	2.23 ± 0.007	+ 3.88	0

หมายเหตุ

[1] เปรียบเทียบกับน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มกลุ่มควบคุมที่ 1 , น้ำหนักเฉลี่ยไก่อายุ 1 วัน เท่ากับ 38.3 กรัม เท่ากันทุกกลุ่มทดลองและผสม *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมในอาหารและในน้ำดื่ม ขนาด 10^6 CFU/ml ให้ทุก 3 วัน ตั้งแต่ไก่อายุ 1 วัน, ให้ S. Typhimurium ขนาด 10^8 CFU/ml เมื่อไก่อายุ 10 วัน, กลุ่ม 1 คือ กลุ่มควบคุมได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะ + S. Typhimurium, กลุ่ม 2 ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและเสริมโพรไบโอติก + S. Typhimurium และกลุ่ม 3 ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม + S. Typhimurium

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *Lactobacillus spp.* และ *S.* Typhimurium ตรวจพบในลำไส้และมูลไก่อายุ 1, 10, 20 และ 30 วัน ตามลำดับ

กลุ่ม	ชนิดแบคทีเรีย	จำนวนแบคทีเรียที่ตรวจพบ (CFU/g)							
		1 วัน		10 วัน		20 วัน		30 วัน	
		ลำไส้	มูล	ลำไส้	มูล	ลำไส้	มูล	ลำไส้	มูล
1	แบคทีเรียประจำถิ่น	5.2×10^4	6.2×10^4	6.0×10^8	6.3×10^9	5.0×10^9	3.0×10^9	1.2×10^9	6.4×10^9
	แลคติกแอซิดแบคทีเรีย	NF	NF	3.0×10^5	4.7×10^6	3.9×10^5	9.5×10^6	1.8×10^6	1.8×10^6
	S. Typhimurium	NF	NF	NF	NF	4.5×10^7	4.0×10^8	9.0×10^6	2.0×10^8
2	แบคทีเรียประจำถิ่น	-	-	6.0×10^7	2.5×10^9	4.0×10^5	3.1×10^8	2.7×10^8	2.9×10^9
	แลคติกแอซิดแบคทีเรีย	-	-	9.8×10^7	1.4×10^9	8.0×10^7	2.2×10^7	1.9×10^8	2.4×10^9
	S. Typhimurium	-	-	NF	NF	1.5×10^6	1.8×10^5	1.6×10^3	5.3×10^4
							NF	NF	NF
3	แบคทีเรียประจำถิ่น	-	-	4.5×10^7	3.5×10^9	1.3×10^8	1.7×10^8	1.9×10^8	6.7×10^8
	แลคติกแอซิดแบคทีเรีย	-	-	6.0×10^7	3.3×10^9	5.0×10^7	8.2×10^7	5.3×10^7	1.6×10^9
	S. Typhimurium	-	-	NF	NF	5.4×10^7	1.4×10^8	2.0×10^4	2.0×10^5
							NF	NF	NF

หมายเหตุ ผสม *Lactobacillus spp.* ผงแห้งแบบผสมในอาหารและน้ำดื่ม ขนาด 10^6 CFU/g และ CFU/ml ตามลำดับ ให้ทุก 3 วัน ตั้งแต่อายุ 1 วัน และป้อน *S.* Typhimurium strain B ขนาด 10^8 CFU/g เมื่อไก่อายุ 10 วัน, กลุ่ม 1 คือ กลุ่มควบคุมได้รับอาหารบริษัทชนะพันธุ์ฟาร์ม จำกัด + *S.* Typhimurium, กลุ่ม 2 ได้รับอาหารบริษัทชนะพันธุ์ฟาร์ม จำกัด ผสมโพรไบโอติก + *S.* Typhimurium และกลุ่ม 3 ได้รับอาหารบริษัทชนะพันธุ์ฟาร์ม จำกัด และผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม + *S.* Typhimurium , NF :- Not Found : ตรวจไม่พบ

จำนวนและสายพันธุ์ของ ล.อ.บ. ที่ตรวจพบในลำไส้ไก่อายุ 1, 10, 20 และ 30 วัน พบว่าไก่กลุ่มที่ 2 และไก่กลุ่มที่ 5 มีจำนวน ล.อ.บ. ที่พบในลำไส้สูงใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง (10^7 - 10^9 cfu/g) และมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม (10^5 - 10^6 CFU/g) ยืนยันผลโดยการตรวจพบ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติกในไก่กลุ่มได้รับโพรไบโอติกทั้ง 2 กลุ่ม อายุ 30 วัน ตรวจพบ *L. acidophilus* TISTR 1338 และ *L. bulgaricus* TISTR 1339 ในลำไส้ไก่กลุ่มได้รับโพรไบโอติกทั้ง 2 กลุ่ม โดยพบ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติกเจริญอยู่ร่วมกับ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์แบคทีเรียประจำถิ่น และเข้าแทนที่ group-D-Enterococcus ทั้งหมดที่ตรวจพบเมื่ออายุ 1 วัน

ผลการเจริญเติบโต น้ำหนักเฉลี่ย ดังตารางที่ 13 และปริมาณ *S.* Typhimurium ที่ตรวจพบตลอดการทดลองดังตารางที่ 14 กล่าวคือ ไก่กลุ่มที่ 2 มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มสูงสุดในไก่ทุกกลุ่มอายุ เป็นกลุ่มที่มีการตรวจพบจำนวน *S. Typhimurium* strain B ต่ำสุดกว่าทุกกลุ่มทดลอง รองลงมา ได้แก่ ไก่กลุ่มที่ 3 และไก่กลุ่มควบคุม ตามลำดับ อย่างไรก็ตามผลของน้ำหนักเฉลี่ยในไก่ทั้ง 3 กลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

จากผลการทดลองข้างต้น สรุปได้ว่า *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมที่ให้สามารถเข้าไปเจริญในลำไส้ไก่และมีผลต้านทานการติดเชื้อ *S.* Typhimurium ได้ ยืนยันได้โดยไก่กลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกมีจำนวน ล.อ.บ. ที่พบเพิ่มขึ้นสูงกว่าในกลุ่มควบคุมไม่ได้รับโพรไบโอติก และยืนยันได้ว่าจำนวน ล.อ.บ. ที่เพิ่มขึ้นเกิดจาก *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติกที่ให้เข้าไปเจริญในลำไส้ไก่ และมีผลทำให้จำนวน S. Typhimurium ลดลง และให้ค่าน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมโดยการให้โพรไบโอติกตั้งแต่ไก่แรกเกิดอายุ 1 วัน ก่อนที่จะมีการติดเชื้อ S. Typhimurium จะให้ผลในการต้านทานการเกิดโรคได้ดีกว่าการให้โพรไบโอติกหลังจากหรือพร้อมๆ กับที่มีการติดเชื้อ S. Typhimurium

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
การอภิปรายผล

นำ *Lactobacillus* spp. จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. acidophilus* TISTR 1338, *L. bulgaricus* TISTR 1339, *L. casei* subsp. *tolerans* TISTR 1341 และ *L. jensenii* TISTR 1342 เก็บรักษาโดยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Dried หรือ Lyophilized) ใช้ภาวะในการเก็บรักษาที่ –20°ซ และใช้สารละลายนมพร่องมันเนย 10% เป็นสารป้องกันความเย็น ตรวจสอบการรอดชีวิตทุก 3 เดือน จนครบ 12 เดือน ผลการทดลองพบว่าสามารถเก็บรักษาเชื้อได้ดี โดยยังคงมีการรอดชีวิตในระดับสูงโดยทุกสายพันธุ์มีการรอดชีวิตสูงกว่าร้อยละ 97 *L. bulgaricus* TISTR 1339 และ *L. casei* subsp. *tolerans* TISTR 1341 มีการรอดชีวิตสูงสุด รองลงมา คือ *L. jensenii* TISTR 1342 และ *L. acidophilus* TISTR 1338 ตามลำดับ การเก็บรักษาเซลล์จุลินทรีย์โดยวิธีนี้อาศัยหลักการระเหิด และการสายดึงน้ำในเซลล์ออก ทำให้จุลินทรีย์ที่อยู่ภายใต้สภาวะการเก็บที่อุณหภูมิต่ำอยู่ในภาวะพักตัว มีการลดลงของแอคติวิตีและกิจกรรมของเอนไซม์แต่สมบัติของเอนไซม์และโปรตีนไม่ถูกทำลาย เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นเอนไซม์ก็สามารถทำงานได้ตามปกติ (Robinson, 1981, Norris และ Ribbon, 1970) การรอดชีวิตของเชื้อผงแห้งหลังเก็บรักษาเป็นเวลานานมีหลายปัจจัยเข้ามาเกี่ยวข้องได้แก่ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ช่วงอายุการเก็บเชื้อ ชนิดของสารป้องกันความเย็นและสภาวะในการเก็บรักษาเซลล์ จุลินทรีย์ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันจะมีลักษณะสรีรวิทยาใกล้เคียงกันส่งผลต่อการรอดชีวิตภายหลังการเก็บภายใต้อุณหภูมิต่ำและขาดแคลนอาหารได้ใกล้เคียงกัน ดังในการทดลองนี้แต่ละสายพันธุ์ของ *Lactobacillus* spp. มีปริมาณการรอดชีวิตภายหลังการเก็บที่ -20 °ซ นาน 12 เดือน ใกล้เคียงกัน ประมาณร้อยละ 97- 98 อีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญคือ ช่วงเวลาในการเก็บเซลล์ในการทดลองนี้เลือกเก็บเซลล์ในช่วงปลาย Log phase ต่อกับ stationary phase ซึ่งเป็นช่วงที่จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุด ในขณะที่อัตราการตายยังคงมีอยู่น้อย และเซลล์ยังคงอยู่ในสภาพสมบูรณ์ ช่วยให้เซลล์ยังคงมีการรอดชีวิตสูงหลังจากการผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Day และ McLellan, 1995) การเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เพิ่มจำนวนสูงสุดทำในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เอ็ม อาร์ เอส ซึ่งมีทวีน 80 เป็นองค์ประกอบซึ่งมีส่วนสำคัญช่วยเพิ่มความเสถียรของเซลล์ระหว่างการเก็บให้มากขึ้น เนื่องจากมีผลเพิ่มระดับคาร์บอนในชั้นลิปิดรอบๆ เซลล์เมมเบรนให้มากขึ้นเป็นผลให้เซลล์เมมเบรนมีความยืดหยุ่นเพิ่มมากขึ้นเป็นการเพิ่มความเสถียรให้กับเซลล์เมมเบรน (Mayra

และ Bigret, 1993) หลังสิ้นสุดทุกขั้นตอนในการทำแห้งแล้วจะเหลือน้ำอยู่ภายในเซลล์ต่ำมาก ประมาณร้อยละ 1 ทำให้ปฏิกิริยาต่าง ๆ ซึ่งมีน้ำเป็นตัวทำละลายและองค์ประกอบภายในเซลล์หยุดชะงัก (de Valdez และคณะ, 1985) ที่สำคัญ คือ ทำให้ความเข้มข้นของสารละลายภายเซลล์เปลี่ยน สารอิเลคโตรไลต์ภายในเซลล์ถูกทำให้เข้มข้นมากขึ้น มีผลทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนภายในเซลล์และเซลล์จะตายในที่สุด (Mellor, 1978) นอกจากนั้นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เซลล์ถูกทำลายระหว่างการทำแห้งแบบเยือกแข็งเกิดจากแรงดันออสโมติก (Osmotic shock) (de Valdez และคณะ, 1983) เพื่อป้องกันเซลล์จึงต้องเลือกเติมสารป้องกันความเย็นที่เหมาะสม โดยสารป้องกันความเย็นจะมีผลเข้าไปแทนที่โมเลกุลน้ำในโครงสร้างโปรตีนทำให้อิเลคโตรไลต์เป็นกลาง ซึ่งจะช่วยป้องกันโปรตีนจากการเสียสภาพ (Mellor, 1978, Moat, 1979) นอกจากนั้นยังมีผลเคลือบป้องกันผิวเซลล์จากการสัมผัสกับออกซิเจนในอากาศในกรณีที่มีการเปิดหลอดหรือขวด (สมบูรณ์, 2539) โดยทั่วไปสารป้องกันความเย็นมักมีโครงสร้างเป็นกลุ่มอะมิโนหรือกลุ่มอัลกอฮอล์ลำดับที่สอง รวมทั้งกลุ่มที่เป็นสารประกอบโปรตีน เช่น นม หรือซีรัมมีผลช่วยคงความเสถียรของเซลล์ได้ (Mellor, 1978 และ,Moat, 1979) ดังในการทดลองนี้ใช้สารละลายนมพร่องมันเนย 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารป้องกันความเย็น พบว่าได้ผลดีโดยหลังเก็บนาน 12 เดือนยังคงมีการรอดชีวิตในระดับสูง นอกจากนั้นยังเป็นสารป้องกันความเย็นมาตรฐานที่มีการใช้ทั่วไปในศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์ เช่น ศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์ในสหรัฐอเมริกา ใช้สารละลายนมพร่องมันเนย 20% ผสมเชื้อให้ได้เข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% และบางครั้งใช้สารละลายซูโครส 24% แทนสารละลายนมพร่องมันเนย ผสมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำตาลเป็น 12% เพื่อเก็บรักษาเชื้อบางจำพวก, (สมบูรณ์, 2539) การเก็บรักษาหลังผ่านการทำแห้งแล้วใช้อุณหภูมิที่-20^{0}ซ ในสภาพที่แห้งในขวดที่มีการปิดผนึกอย่างดีเพื่อไม่ให้ผลิตภัณฑ์สัมผัสกับความชื้นและอากาศซึ่งจะมีผลกระทบต่อการรอดชีวิตได้ เนื่องจากผลิตภัณฑ์มีความสามารถที่จะดูดความชื้นได้ดี

ตรวจสอบหาจำนวนล.อ.บ. ในอาหารไก่ของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ (มหาชน)จำกัด ตรวจไม่พบ เมื่อนำ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ผสมในน้ำกรองและในอาหารไก่ของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ (มหาชน) จำกัด ตรวจสอบความสามารถในการเจริญและอยู่รอด เพื่อนำไปใช้จริงในงานภาคสนาม โดยทดลองที่ 21 ^{0}ซ และ 30^{0}ซ โดยที่ 21^{0}ซ เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเลี้ยงไก่ เพื่อให้ไก่มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดี (วรวิทย์, 2532) พบว่า จำนวน ล.อ.บ. ตรวจพบในน้ำกรองและในอาหารไก่ที่ทั้ง 2 อุณหภูมิมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบที่อุณหภูมิเดียวกัน ในน้ำกรองจะมีจำนวน *Lactobacillus* spp. ที่ตรวจพบสูงกว่าทั้ง 2 อุณหภูมิ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมสามารถรอดชีวิตในน้ำได้ดีกว่าในอาหาร

ไก่ เนื่องจาก *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถผสมและละลายเข้ากันในน้ำได้อย่างดี สารอาหารที่ยังเหลืออยู่สามารถละลายปนมาในน้ำทำให้ *Lactobacillus* spp. สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ ส่งผลให้จำนวน *Lactobacillus* spp. สูงขึ้นนับตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 สำหรับในอาหารไก่มีภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญต่ำกว่าในน้ำกรอง. ได้แก่ การขาดแคลนน้ำและสารอาหาร การสัมผัสกับออกซิเจนและความชื้น และมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ อยู่มาก ทำให้จำนวน ล.อ.บ. ในช่วงหลังชม.ที่ 36 ลดต่ำลงกว่าปริมาณที่ให้ตั้งต้นประมาณ 1-2 log cycle อย่างไรก็ตามใน 24 ชั่วโมงแรกยังคงมีความเข้มข้นใกล้เคียงกับความเข้มข้นตั้งต้น 10^6 CFU/g ซึ่งเป็นปริมาณที่ต้องการให้ในการทดสอบภาคสนาม มีรายงานการนำ *Lactobacillus* spp. ในรูปผงแห้งในมาใช้เสริมในอาหารสัตว์ พบว่าสามารถตรวจพบการรอดชีวิตในอาหารแห้งได้นานกว่า 2 สัปดาห์และรวมทั้งกลุ่มแอนแอโรปส์แบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์สามารถมีชีวิตอยู่ได้โดยไม่มีการสูญเสียการรอดชีวิตนานกว่า 1 สัปดาห์ (Ella และ Barnes, 1979) จึงเป็นแนวทางในการนำผลที่ได้ไปใช้ทดสอบจริงในการเสริมโพรไบโอติกในน้ำดื่มและในอาหารไก่เพื่อเปรียบเทียบผลที่มีต่อการเจริญและการต้านทานโรคติดเชื้อในไก่ต่อไป

เมื่อนำ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสม 4 สายพันธุ์ เสริมในการเลี้ยงไก่เพื่อดูผลต่อการเจริญเติบโต เมื่อครบการเลี้ยง 42 วัน กลุ่มที่มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด คือ กลุ่มที่มีจำนวน ล.อ.บ. ตรวจพบในลำไส้สูงสุดและสม่ำเสมอมากสุด รวมทั้งตรวจพบ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติกที่ให้มากสุด ได้แก่ ไก่กลุ่มที่ 5 ได้รับโพรไบโอติกในน้ำดื่ม กลุ่มที่มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงรองลงมา คือ ไก่กลุ่มที่ 2 ได้รับสารปฏิชีวนะและโพรไบโอติกเสริมในอาหาร มีจำนวนและสายพันธุ์ของ *Lactobacillus* spp. ที่พบโดยเป็นสายพันธุ์ที่ให้รองลงมา ทั้ง 2 กลุ่มมีน้ำหนักเฉลี่ยและจำนวน ล.อ.บ. ที่พบสูงกว่ากลุ่มควบคุมตลอดระยะการเลี้ยง สำหรับค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารมีค่าใกล้เคียงกันระหว่างกลุ่มได้รับโพรไบโอติกในน้ำดื่มและกลุ่มควบคุมได้รับสารปฏิชีวนะในอาหาร โดยทั้ง 2 กลุ่มมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P< 0.05$) กับไก่กลุ่มทดลองอื่นๆ แสดงให้เห็นว่า *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติกที่ให้ในรูปผงแห้งแบบผสมมีผลเร่งอัตราการเจริญได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมโดยใช้ปริมาณอาหารใกล้เคียงกัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติกที่ให้สามารถเข้าไปเจริญอยู่รอดและครอบครองพื้นที่ในลำไส้ได้นับแต่วันแรกๆ ของการเลี้ยงเป็นการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ต่อลำไส้นับตั้งแต่ไก่แรกเกิด โดยสามารถเข้าไปแทนที่ *Enterococcus* spp. และเจริญอยู่ร่วมกับ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์แบคทีเรียประจำถิ่นได้ และมีผลช่วยควบคุมสมดุลย์ของแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหาร ยืนยันได้จากจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นที่ตรวจพบในลำไส้

กลุ่มทดลองได้รับโพรไบโอติกมีจำนวนคงที่และค่อนข้างสม่ำเสมอตลอดการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มไม่ได้รับโพรไบโอติก ตามตารางที่ 7 สาเหตุที่ *Lactobacillus* spp. สามารถเข้าเจริญแทนที่แบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ ในลำไส้ได้ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีความจำเพาะเจาะสูงต่อผู้อาศัยและบริเวณที่เข้ายึดเกาะจึงสามารถแข่งขันเข้ายึดเกาะกับผนังเยื่อบุของระบบทางเดินอาหารตั้งแต่ส่วนกระเพาะพักจนถึงระบบลำไส้ได้ดี (Watkins และ Miller, 1982) นอกจากนี้ *Lactobacillus* spp. ยังสามารถผลิตกรดแลคติก มีผลลด pH ในระบบทางเดินอาหารโดยเฉพาะในลำไส้ รวมทั้งสร้างสารต่อต้านจุลชีพ ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิทิล ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มก่อโรคในลำไส้ได้ (Fuller, 1989 และ 1992) รวมทั้งมีผลลดการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ยูรีเอส เป็นการลดการสะสมแอมโมเนียซึ่งเป็นพิษต่อสัตว์ (Yeo และ Kim, 1997) ภาวะความเป็นกรดในระบบทางเดินอาหารนี้ยังมีผลช่วยการดูดซึมสารอาหารบางตัวให้ดีขึ้น (Shirota,1969) ยังพบอีกว่า *Lactobacillus* spp. สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสช่วยในการย่อยคาร์โบไฮเดรตในกระเพาะพักได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ในสภาพที่มีความเป็นกรดสูง pH ประมาณ 4.2-4.5 (Champ, 1983) เป็นการปรับปรุงเมตาบอลิสมของจุลินทรีย์และผู้อาศัย และเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้อาหารของสัตว์ให้ดีขึ้น (Nousiaine และ Setala, 1992) ซึ่งส่งผลช่วยเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ให้ดีขึ้นได้ สามารถสรุปได้ว่าการเสริมโพรไบโอติกให้ไก่กินทั้งในน้ำดื่มและในอาหารไก่ร่วมกับสารปฏิชีวนะสามารถเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ได้ดีกว่าการเสริมสารปฏิชีวนะ และการให้โพรไบโอติกเสริมในน้ำดื่มจะให้ประสิทธิภาพดีกว่าการให้เสริมในอาหาร

สาเหตุที่การให้โพรไบโอติกเสริมในน้ำดื่มมีผลเร่งการเจริญได้ดีกว่า น่าจะมาจาก *Lactobacillus* spp. สามารถเจริญแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนในน้ำดื่มได้ดีกว่าในอาหารไก่ และให้ความสม่ำเสมอของจำนวน *Lactobacillus* spp. มากกว่า (ผลดังตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ) เป็นการเพิ่มโอกาสของ *Lactobacillus* spp. ในการเข้าไปเจริญและเข้าเกาะติดกับผนังของระบบทางเดินอาหารให้มากขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยง สำหรับการเสริมในอาหารไก่โอกาสที่หัวเชื้อผงแห้งจะสูญเสียไปโดยไก่ไม่ได้รับในช่วง 19-42 วันของการเลี้ยงจะมีมากกว่าในช่วงแรก เนื่องจากอาหารไก่กระทงช่วง 19-42 วัน มีเม็ดใหญ่และยาวกว่า โอกาสที่หัวเชื้อผงแห้งจะเกาะติดกับเม็ดอาหารจะน้อยกว่า และน่าจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้จำนวน ล.อ.บ. ในลำไส้ไก่กลุ่มได้รับโพรไบโอติกในอาหารช่วง 19-42 วัน มีค่าลดลง ซึ่งการผสมโพรไบโอติกลงในน้ำดื่มจะไม่เกิดปัญหาในข้อนี้ ไก่ที่ได้รับน้ำดื่มผสมโพรไบโอติกมีความเข้มข้นสม่ำเสมอตลอดการทดลองส่งผลต่อจำนวน ล.อ.บ. ในลำไส้ที่มากกว่าและมีผลปรับปรุงอัตราการเจริญของไก่กลุ่มได้รับโพรไบโอติกในน้ำดื่มได้ดีกว่า

แต่อย่างไรก็ตามสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของ *Lactobacillus* spp. ที่ให้แต่ละสายพันธุ์ไม่เท่ากัน เนื่องจาก *Lactobacillus* spp. เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีความจำเพาะเจาะสูงต่อผู้อาศัยและบริเวณที่เข้าอาศัย จึงตรวจพบ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ที่ให้บางสายพันธุ์ในลำไส้เท่านั้น ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกในทุกกลุ่มทดลองคือ *L. acidophilus* TISTR 1338 สำหรับ *L. bulgaricus* TISTR 1339 และ *L. casei* subsp. *tolerans* TISTR 1341 มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกในบางกลุ่มเท่านั้น และ *L. jensenii* TISTR 1342 ไม่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกในการทดลองนี้เนื่องจากตรวจไม่พบในลำไส้ อาจมีสาเหตุมาจากขาดความจำเพาะเจาะจงในการเข้ายึดเกาะในบริเวณเยื่อบุผนังลำไส้และระบบทางเดินอาหารในไก่พันธุ์นี้ จึงไม่สามารถเจริญอยู่ในลำไส้และถูกขับออกทางระบบขับถ่าย

ผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นสอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Toruero (1973), Couch (1978), Arens (1981) และฐิติพงษ์ (2539)) พบว่า การเสริมโพรไบโอติกให้ไก่กินสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตได้ดีกว่าไก่กลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ หรือได้รับอาหารที่มีการเสริมสารปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว โดยมีรูปแบบการใช้ต่างกัน งานทดลองของฐิติพงษ์ (2539) ทำการเสริม ล.อ.บ. ให้ไก่กิน ในรูปสารละลายเซลล์สดในโซเดียมคลอไรด์ 0.85% พบว่าสามารถเพิ่มการเจริญและน้ำหนักเฉลี่ยในไก่ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับไก่กลุ่มไม่ได้รับโพรไบโอติก ($P < 0.05$) ล.อ.บ. ที่ให้ประกอบด้วย *Lactobacillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้และเพิ่ม *L. acidophilus* อีก 1 สายพันธุ์ในรูปผสมจำนวน 5 สายพันธุ์ และให้ในปริมาณความเข้มข้นเท่ากับที่ให้ในการทดลองนี้ แนวโน้มของการทดลองทั้ง 2 เป็นไปในทางเดียวกัน แต่ในงานวิจัยนี้ผลของน้ำหนักเฉลี่ยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) อาจมีสาเหตุมาจากความแตกต่างของพันธุ์ไก่ที่ใช้ทดลอง สูตรอาหารและวัตถุดิบที่ใช้ประกอบสูตรอาหาร ชนิดและจำนวนสายพันธุ์ของโพรไบโอติก และรูปแบบการให้ โดยสายพันธุ์ไก่ที่ใช้ในการทดลองของฐิติพงษ์ตรวจไม่พบจำนวน ล.อ.บ. ในลำไส้ไก่เลยนับตั้งแต่แรกเกิด การให้ *Lactobacillus* spp. จึงมีผลเพิ่มจำนวน *Lactobacillus* spp. โดยตรงและไม่มีผลรบกวนและแข่งขันการเจริญจาก ล.อ.บ. ชนิดอื่นในลำไส้ ในงานวิจัยนี้ตรวจพบ ล.อ.บ. ในลำไส้ไก่นับตั้งแต่วันแรกของการเลี้ยงและมีจำนวนเพิ่มสูงขึ้นตามอายุ มีแหล่งมาจากในลำไส้เองและจากการปนเปื้อนในอาหารไก่ส่งผลรบกวน *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติก โดย *E. faecium* ที่ปนเปื้อนมาจากอาหารไก่ เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการเป็นโพรไบโอติกช่วยเร่งการเจริญของสัตว์ในฟาร์มและใช้ป้องกันโรคติดเชื้อท้องร่วงได้ (Fuller และคณะ, 1979) *E. faecium* ที่ไก่ได้รับจากอาหารน่าจะส่งผลช่วยเร่งการเจริญเติบโตของไก่ในกลุ่มควบคุมและอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลของน้ำหนัก

เฉลี่ยของไก่ในกลุ่มควบคุมได้รับสารปฏิชีวนะและกลุ่มทดลองได้รับโพรไบโอติกแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P<0.05$) อย่างไรก็ตาม *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติกมีประสิทธิภาพเป็นโพรไบโอติกในการทดลองนี้ได้ดีกว่า เนื่องจากสามารถเจริญแทนที่ *E. faecium* ในลำไส้ไก่กลุ่มทดลองอายุ 42 วันได้ทั้งหมด

สำหรับข้อดีของการให้โพรไบโอติกในรูปผงแห้งผสมในน้ำดื่มให้ไก่ ได้แก่ มีความสะดวกเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในฟาร์มหรือโรงเรือนในระดับอุตสาหกรรมและในระดับครัวเรือน เนื่องจากสะดวกในการจัดเก็บและในการเตรียม ไม่ยุ่งยาก ประหยัดวลา และแรงงานคน และสามารถเก็บไว้ใช้ได้ในเวลานานโดยมีการรอดชีวิตสูงภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสม เมื่อเทียบกับการให้ในรูปสารละลายเซลล์สดป้อนให้ไก่ จะมีความยุ่งยากมากกว่า และเป็นไปได้ยากในการปฏิบัติจริงเนื่องจากสิ้นเปลืองเวลาและแรงงาน

ทดสอบประสิทธิภาพในการต้านทานการติดเชื้อ S. Typhimurium ในไก่โดยใช้ปริมาณความเข้มข้นและเว้นระยะการให้ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมไว้เท่าเดิม คือ ความเข้มข้น 10^6 CFU/g หรือ CFU/ml และให้ทุก 3 วันตั้งแต่ไก่อายุ 1 วัน ใช้สภาวะการทดลองที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการทดสอบผลต่อการเจริญเติบโตของไก่พันธุ์เนื้อ คือ การเสริมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม และการเสริมสารปฏิชีวนะและโพรไบโอติกในอาหาร โดยคาดว่าน่าจะให้ประสิทธิภาพในการต้านทานการติดเชื้อ S. Typhimurium ได้ดีเช่นเดียวกันที่ให้ผลในการเร่งการเจริญ

การทดลองครั้งที่ 1 ใช้ไก่พันธุ์เนื้อของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ (มหาชน) จำกัด ทำการเลี้ยงนาน 36 วัน ไก่กลุ่มได้รับการเสริมโพรไบโอติกทั้ง 2 กลุ่มมีจำนวน ล.อ.บ. สูงใกล้เคียงกันและสูงกว่าไก่กลุ่มควบคุมไม่ได้รับโพรไบโอติก และตรวจพบ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์โพรไบโอติกที่ให้ในลำไส้ไก่กลุ่มทดลองทั้ง 2 กลุ่ม ได้แก่ *L. acidophilus* TISTR 1338 และ *L. bulgaricus* TISTR 1339 สำหรับ *L. jensenii* TISTR 1342 ไม่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกในการทดลองนี้ เนื่องจากตรวจไม่พบในลำไส้ไก่กลุ่มทดลองใดๆ เปรียบเทียบในทุกกลุ่มทดลองไก่กลุ่มได้รับโพรไบโอติกน้ำดื่มมีประสิทธิภาพในการต้านทานการติดเชื้อ S. Typhimurium ดีที่สุด เนื่องจากตรวจไม่พบ S. Typhimurium ในลำไส้เลยเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง 36 วัน ($10^8 \rightarrow 0$ CFU/g) ใกล้เคียงกับกลุ่มได้รับโพรไบโอติกเสริมในอาหารร่วมกับสารปฏิชีวนะ ($10^8 \rightarrow 0$ และ 10^2 CFU/g) และไม่แตกต่างกับไก่กลุ่มควบคุมมากนัก (10^2 CFU/g) สาเหตุที่จำนวน S. Typhimurium ในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุมค่อนข้างมีค่าใกล้เคียงกับไก่กลุ่มทดลองในแต่ละช่วงระยะการเลี้ยง อาจเนื่องมาจากในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุมมีจำนวน ล.อ.บ. อยู่ในระบบทางเดินอาหารสูงอยู่แล้ว การที่ตรวจพบ *E. durans* และ *E. faecium* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบในอาหารไก่สำเร็จรูปในลำไส้ไก่กลุ่ม

ควบคุมด้วย แสดงว่า ล.อ.บ. สายพันธุ์แบคทีเรียประจำถิ่นและ ล.อ.บ.จากอาหารไก่สำเร็จรูป สามารถเจริญอยู่ร่วมกันในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุมได้โดยเข้าครอบครองพื้นที่ในลำไส้ นับตั้งแต่วันแรก ๆ ของการเลี้ยง ก่อนที่ *Lactobacillus* spp. จะมีบทบาทเข้ามาเจริญแทนที่ในช่วงหลัง 18 วันของการเลี้ยง ส่งผลให้มีการลดลงของจำนวน S. Typhimurium ในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุมเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง รวมทั้งจำนวน S. Typhimurium ที่ให้ถึง 3 ครั้ง อาจมีการรบกวนกันเองซึ่งอาจจะมีผลต่อจำนวน *S.* Typhimurium ที่นับได้ และการค่อย ๆ เพิ่มขนาดของ *S.* Typhimurium ที่ให้กับไก่ถึง 3 ครั้ง อาจเป็นการกระตุ้นให้ร่างกายเกิดมีภูมิต้านทานขึ้นได้ ทำให้พยาธิสภาพของโรคไม่ปรากฏให้เห็น สำหรับค่าน้ำหนักเฉลี่ยของไก่เมื่อสิ้นสุดการทดลองไม่สอดคล้องกับความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อ *S.* Typhimurium กล่าวคือ กลุ่มที่มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุดคือกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกเสริมร่วมกับสารปฏิชีวนะ รองลงมาคือ กลุ่มควบคุมได้รับสารปฏิชีวนะและกลุ่มได้รับโพรไบโอติกเสริมในน้ำดื่ม ตามลำดับ จึงไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่าการเสริม *Lactobacillus* spp. ให้ไก่กินสามารถต้านทานการติดเชื้อ *S.* Typhimurium ได้ในไก่พันธุ์เนื้อของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ (มหาชน) จำกัด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

ข้อสรุป

1. เก็บรักษาเชื้อ *Lactobacillus spp.* จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. acidophilus* TISTR 1338, *L. bulgaricus* TISTR 1339, *L. caei* subsp. *tolerans* TISTR 1341, *L. jensenii* TISTR 1342 โดยวิธีเยือกแข็งใช้สารละลายนมพร่องมันเนย 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็นสารป้องกันความเย็นเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ -20° ซ นาน 12 เดือน สามารถเก็บรักษาเชื้อโดยทุกสายพันธุ์ยังคงมีการรอดชีวิตในระดับที่สูงกว่าร้อยละ 97

2. นำ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสม 4 สายพันธุ์ผสมในน้ำดื่มและในอาหารไก่ มีการรอดชีวิตอยู่ในระดับที่สูงใกล้เคียงกับความเข้มข้นตั้งต้นนานกว่า 3 วัน โดย *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมจะมีการรอดชีวิตในน้ำดื่มสูงกว่าในอาหารไก่

3. การเสริม *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมในน้ำดื่มและการเสริมสารปฏิชีวนะและโพรไบโอติกในอาหารมีแนวโน้มในการเร่งการเจริญเติบโตในไก่ได้ดีกว่าการเสริมสารปฏิชีวนะในอาหารไก่ โดยการเสริม *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมในน้ำดื่มมีแนวโน้มให้ผลเร่งการเจริญได้ดีที่สุดในไก่กระทง สำหรับสายพันธุ์ที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกในการทดลองนี้ คือ *L. acidophilus* TISTR 1338, *L. bulgaricus* TISTR 1339 และ *L. caei* subsp. *tolerans* TISTR 1341

4. ทดสอบผลการต้านทานการติดเชื้อ S. Typhimurium ในไก่พันธุ์เนื้อของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ (มหาชน) จำกัด พบว่า ไก่กลุ่มได้รับโพรไบโอติกเสริมในน้ำดื่มมีแนวโน้มในการลดปริมาณ S. Typhimurium ในลำไส้ไก่กระทงได้ดีที่สุด แต่ก็ใกล้เคียงกับกลุ่มได้รับสารปฏิชีวนะและโพรไบโอติกเสริมในอาหาร ผลที่ได้ในไก่กลุ่มทดลองทั้ง 2 ให้ประสิทธิภาพดีกว่าการให้สารปฏิชีวนะเสริมในอาหารไก่เพียงอย่างเดียว แต่ไม่สอดคล้องกับผลของน้ำหนักเฉลี่ยกลุ่มได้รับสารปฏิชีวนะและโพรไบโอติกเสริมในอาหารให้น้ำหนักเฉลี่ยสูงสุดและมากกว่าในกลุ่มควบคุมได้รับสารปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว

ส่วนอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมเศรษฐกิจพาณิชย์. 2541. ปริมาณ-มูลค่าส่งออกสินค้าอาหารของไทย ปี 2540. นิตยสารสำหรับผู้ส่งออกและผู้บริหาร: Export reviews. 257: 9-21.

กองสัตวแพทย์สาธารณสุข. 2537. เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ปีกเพื่อการส่งออก. เอกสารประกอบการฝึกอบรมกองสัตวแพทย์สาธารณสุข. กรมปศุสัตว์.

จรัญ จันทลักขณา. 2519 สถิติวิเคราะห์และวางแผนวิจัย. กรุงเทพ ฯ. ไทยวัฒนาพานิช .

จารุรัตน์ เศรษฐภักดี. 2528. อาหารสัตว์เศรษฐกิจ. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ฐิติพงษ์ ธนะรัชติการนนท์. 2539. การใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นโพรไบโอติกเสริมอาหารไก่. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทัศนีย์ อภิชาติสรางกูร. 2540. สุขศาสตร์สัตว์. สารพัดพิมพ์. เชียงใหม่.

นภา โลห์ทอง. 2522. เอกสารประกอบการบรรยายวิชาจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

———. 2535. กล้าเชื้อแบคทีเรีย กล้าเชื้ออาหารหลักและเทคโนโลยีการผลิต.. กรุงเทพมหานคร. สำนักพิมพ์ฟันนี่ พับลิชชิ่ง.

นวลจันทร์ พารักษา, อุทัย คันโธ, ชินะทัตร์ นาคะสิงห์ และ เนตรมิตร สุขมณี. 2533. การใช้ส่วนผสมจุลินทรีย์ประเภทโพรไบโอติกและกลุ่มเอนไซม์เสริมในอาหารลูกสุกรหย่านม. รายงานประชุมวิชาการสาขาสัตวศาสตร์. ครั้งที่ 28. 29-31 มกราคม.

พรเทพ เมฆารักษ์ภิญโญ. 2538. ผลของการทำแห้งแบบเยือกแข็งและแบบพ่นฝอยต่อโยเกิร์ตพร้อมดื่มผง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์. 2524. การผลิตและการเก็บรักษาบักเตรีแลคติกที่ใช้เป็นอาหารเสริมสุกรในรูปเชื้อผง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มาลิน จุลศิริ. ยาต้านจุลชีพ: ความรู้พื้นฐานและประยุกต์. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2532.

มาลิน อังสุรังษี. 2524. ปัญหายาต้านเชื้อแบคทีเรียในสัตว์. วารสารสัตวแพทย์. 3: 150-161.

มาลินี ลิ้มโภคา. 2540. ยาต้านจุลชีพในสัตว์ : สัตว์บกและสัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 4 คณะสัตแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2540.

ยุคล ลิ้มแหลมทอง. 2533. Feed additives: การใช้ยาและสารเคมีผสมในอาหารสัตว์. กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์.

ลิขิต เอียดแก้ว. 2532. ไก่กระทง. ฐานเกษตรกรรม. นนทบุรี.

วรรณิภา เพี้ยนภักตร์. 2539. การใช้แบคทีเรียเสริมในอาหารกุ้ง. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วรวิทย์ ศิริพลวัฒน์. 2532 . เอกสารประกอบการฝึกอบรม หลักสูตรการเลี้ยงไก่เชิงธุรกิจ. ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน,

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพ ฯ . 2539.

อุทัย คันโธ. 2529 อาหารและการผลิตอาหารเลี้ยงสุกรและสัตว์ปีก. ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุทัย คันโธ. 2535. หลักการโพรไบโอติกในเชิงอาหารสัตว์. สุกรสาร์น. 72: 11-15.

ภาษาอังกฤษ

Arens, L. G. 1981. Influence of *L. acidophilus* administered via the drinking water on broiler performance. Poultry Sci. 60 : 1617. (Abstract).

Austin, B., Stuckey, L. F., Robertson, P.A. W., Effendi, I. And Griffith, D. R. W. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginonlyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. J. Fish. Diseases. 18: 93-96.

Barrow, P. A. 1992. Probiotics: The Scientific basis. (eds. Fuller, R.). Chapman & Hall. London.

Birds, H. R. 1969. Biological basis for the use of antibiotics in poultry feeds. The use of drugs in animal feeds. Proceeding of a Symposium National Academy of Science. Washington D. C.

Bjorck, L., Rosen, G. G., Marshall, V., and Reiter, B. 1975. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against Pseudomonas and other Gram- negative bacteria. J. Appl. Microbiol., 30:199.

Brock, T. D. and Madigan, M. T. 1991. Biology of Microorganism. 6th eds. London. Prentice-Hall International.

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

Buchanan, R. E. Gibbons, N. E. 1974. Bergey ' manual of determinative bacteriology. 8th ed. Baltimore. William and Wilkins.

Byun, J. W., Park, S. C., Benno, Y. and Oh, T. K. 1997. Probiotic effect of *Lactobacillus* sp. DS-12 in flounder (*Paralichthys ovivaceus*). J. Gen Appl. Microbiol. .43: 305-308.

Castaldo, D. J. 1991. Combined in feed: Antibiotics and Probiotics. Feed International. 7: 20-25.

Champ, M., Szylit, O., Raibaud, P., and Ati- Abdelkader, N. 1983. Amylase production by three Lactobacillus strains isolated from chicken crop. J. Appl. Bacteriol. 55 :487.

Chapman, J. D. 1988. Probiotiecs, acidifiers and yeast cultrue: a Place for natural additives in pig and poultry production, in Biotechnology in the Feed Industried, (ed. Lyons. T.P.) Proc- Alltech' s 4 the Ann. Symp.

Corrier, D. E., Nisbet, D. J., Scanlan, C. M., Hollister, A. G., Caldwell, D. J., Thomas, L. A., Hargis, B. M. , Tomkins, T., Deloach, J. R. 1995. Treatment of commercial broiler chickens with a characterized culture faecal bacteria to reduce *Salmonella* colonization. Poultry Sci . 74: 1093-1101.

Couch, J. R. 1978. Poultry researchers outline benefits of bacteria, fungistatic compounds, other feed additives. Feedstuff. 50: 6.

Davidson, P. M. and Hoover, D. G. 1993. Antimicrobial components from lactic

acid bacteria, in Lactic Acid Bacteria. (ed. By Salminen, S. and Wright, A. V.) New York, Marcel Dekkar.

Day, J. G. and McLellan, M. R. 1995. Method in molecular biology: Cryopreservation and freeze drying protocols. New Jersey . Humana Press,.

De Valdez, G. F., de Giori, G. S., de Ruiz, H. A. P. and Oliver, G. 1983. Protective effect of adonitol of lactic acid bacteria subjected to freeze drying. Applied Environ. Microbiol. 45: 302 -304.

. . 1985. Effect of drying medium on residue moisture content and viability of freeze- dried lactic acid bacteria. Applied Environ. Microbiol. 49:413-415.

De Vyust, L. and Vandamme, E. J. 1994. Bacteriocins of lactic acid bateria. London, Chapman & Hall.

Ella, M. and Barnes, O. B. E .1979. The Intestinal microflora of poultry and Game Birds during life and after storage. J . Appl. Bacteriol. 46: 407-419.

Frazier, M. C. and Westhoff. 1979. Food Microbiolofy. 3rd ed. New Delhi. Tata Mcgraw-Hill publishing.

Fuller, R. 1975. Nature of the determinant responsible for the adhesion of Lactobacilli to chicken crop epithelial cells. J Gen Microbiol. 87: 245-250.

. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378.

. 1992. Probiotics: The scientific basis. London. Chapman & Hall.

Gilliland, S. E. 1979. Beneficial interrelationships between certain microorganism and humans : candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. J. Food Prot. 42 : 164.

Haddadin, M. S. Y., Abulrahim, S. M., Hashlamoun, E. A. R., Robinson, P. K. 1996. The Effect of *Lactobaacillus acidophilus* on the production and chemical composition of hen' s eggs. Poultry Sci. 75 : 491-494.

Havenaar, R. and Huis in't Veld, J. H. J. 1992. Probiotics: a general view, in lactic acid bacteria in heath and disease, vol. 1. (ed. Wood, J. B. J.), Elsevier Applied Science Publishers.

Javed, T., Hameed, A. and Siddigue, M. 1993. Competitive exclusion of *Salmonella* by *Lactobacillus* : A stragey to control Salmonellosis in chicken. Proc. Pakistan Congr. Zool. 13: 493-500.

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

Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Regular non-sporing gram-positive rods, in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. (eds. Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., Holt., J. G.), William and Wilkins, Baltimore. Kets,

E. P., Teunissen, P. J. M. and Mout, J. A. M. 1996. Effect of compatible solution survival of lactic acid bacteria during spray of plain yoghurt. J. Food Sci. 62 : 259 -261.

Kim, S. S. and Bhowmik , S. R. 1990. Survival of lactic acid bacteria during spray of plain yoghurt. J. Food Sci. 55 : 1008-1010, 1048.

Lingle, R. 1986. Drying: ancient method has new twists : Prepared Food. 155 : 92-96.

Mayra- Makinen, A., and Bigret, M. 1993. Industrial use and production of lactic acid bacteria, in Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekkar, New York.

Mellor, J. D. 1978. Fundamentals of freeze drying. Academic Press. London.

Miles, R. D., Arafa, A. S., Harmes, R. H., Carlson, C. W., Reid, B. L. and Crawford, J. S. 1981. Effect of a living nonfreeze-dried *Lactobacillus acidophilus* culture on performance, egg quality and gut microflora in commercial layers. Poultry Sci. 60 : 993-1004.

Miller, B. M. and Warren, L. 1976. Industrial Microbiology. New York. McGraw- Hill

Moat, A. G. 1979. Microbial Physiology. New York. John Wiley & Sons.

Nisbet, D. J., Corrier, D. E., DeLoach, J. R. 1995. Probiotic for control of *Salmonella*. United States Patent. No. 5,478,557.

Norris, J. R. and Ribbons, D. W. 1970. Method in Microbiology. Academic Press. London.

Nousianean, R. J. and Setala, A. T. 1992. Lactic acid bacteria as animal probiotics, in Lactic acid bateria in health and disease : volume 1. London. Elsevier Applied Sciene.

Parker, R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotics story. Animal Nutriton and Health. 29: 4-8.

Prescott, S. C. and Buggat, C. G. 1988. Industrial microbiology. 3rd ed. Kogakushi Co. Ltd. Tokyo.

Robinson, R. R. 1981. Freeze- dried starter concentrates part 1: their characteristics and potential application to the production of cheese and yoghurt. Dairy Indus. Inter. 46 : 15-21.

Sharpe, M. E. 1981. The genus Lactobacillus, in The Procaryotes : A Handbook on Habitats. Isolation and Identification of Bacteria. (eds. Starr, M. P., Stolp, H., Truper, H. G, Balows, A., and Schelgel, H. G.). Berlin. Springer-Verlag.

Shitora, M. 1962. Lactobacillus in Health and Diseases. Monographs published in Kyoto, Japan and obtained form the yakult Honsha Co. Ltd., Tokyo.

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.

Stanier, R. Y. 1986. The Microbial World, 5th ed. New Jersey. Prentice- Hall.

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

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

Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C. L. 1986. Microbiology: An Introduction. 2nd ed. London. The Benjamin/Cummings Publishing.

Tortuero, F. 1973. Influence of the implanation of *Lactobacillus acidophilus* in chickens on the growth, feed conversion, malabsorbtion of fats syndrome and intestinal flora. Poultry Sci. 52: 197-203.

Velraeds, M. M. G., van der Mei, H., Reid, G. and Busscher, H. J. 1996. Inhibition of Initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* Isolates. Applied. Environ. Microbiol. 62 : 1958-1963.

Watkins, B. A., Miller, B. F. , Neil, D. H. 1982. In vivo inhibitory effect of *Lactobacillus acidophilus* against pathogenic *Escherichia coli* in gnotobiotic chicks. Poultry Sci. 61: 1298-1308.

Wood, J. B. 1985. Microbiology of Fermented Foods. London. Elsvier Applied Science.

Yeo, J. and Kim, K. 1997. Effect of feeding diets containing an antibiotic, a probiotic, of Yucca Extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. Poutry Sci. 76 : 381-385.

Zani, J. L., da Cruz, F. W., Dos Sautos, A. F. and Tumes, C. G. 1988. Effect of probiotic CenBiot on the control of diarrhea and feed efficiency in pigs. J. Appl. Microl. 84 : 68-71.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดลอง

1. อาหารเหลวแลคโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส (Lactobacilli MRS broth)

โปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 (Proteose peptone No.3)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
เดกซ์โตส (Dextrose)	20.0	กรัม
ทวีน 80 (Tween 80)	1.0	กรัม
ไตรแอมโมเนียมซิเตรท (tri- ammonium citrate)	2.0	กรัม
โซเดียมอะซิเตรท (CH_3COONa)	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.1	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)	0.04	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 6.5+0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 15 นาที) ถ้าต้องการอาหารแข็งเติมวุ้นผง 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

2. อาหารนมพร่องมันเนย (10% skim milk)

นมพร่องมันเนย (skim milk)	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มล.

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ / ตารางนิ้ว 100 ^{o}ซ 10 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. อาหารแข็งทริปติกซอย (Tryptic soy broth)

ทริปโตน (Tryptone)	17.0	กรัม
ผงสกัดถั่วเหลือง (Soytone)	3.0	กรัม
เดกซ์โตส (Dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.5	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.3 + 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว 121 ^{0}ซ เป็นเวลา 15 นาที)

4. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซาลโมเนลลา ชิเจลลา

ผงสกัดจากเนื้อ (Beef Extract)	5.0	กรัม
โปรติโอสเปปโตน (Proteose peptone)	5.0	กรัม
แลคโตส (Lactose)	10.0	กรัม
เกลือน้ำดี (Bile salt No.3)	8.5	กรัม
โซเดียมซิเตรท (Sodium citrate)	8.5	กรัม
โซเดียมไธโอซัลเฟต (Sodium thiosulfate)	8.5	กรัม
เฟอริก ซิเตรท (ferric citrate)	1.0	กรัม
บริลเลียนกรีน (Brilliant Green)	0.33	กรัม
นิวทรอลเรด (Neutral red)	0.025	กรัม
วุ้นผง (Agar)	13.5	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.0 + 0.2

ต้มเดือดประมาณ 2 - 3 นาที จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ

5. อาหารที เอส ไอ (TSI agar)

เคซีน (Casein)	10.0	กรัม
เปปโตน (Peptone)	10.0	กรัม
กลูโคส (glucose)	1.0	กรัม
แลคโตส (Lactose)	10.0	กรัม
ซูโครส (Sucrose)	10.0	กรัม
เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 .7H_2O$)	0.2	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)	0.3	กรัม
ฟีนอลเรด (Phenol red)	0.024	กรัม
วุ้นผง (Agar)	13.0	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.0 + 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 15 นาที)

6. อาหารแอล ไอ เอ (LIA Agar)

เปปโตน (Peptone)	5.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3.0	กรัม
เด็กซโตรส (Dextrose)	1.0	กรัม
แอล-ไลซีน ไฮโดรคลอไรด์ (L- Lysine HCl)	10.0	กรัม
เฟอริก แอมโมเนียมซิเตรต (Ferric ammonium citrate)	0.5	กรัม
โซเดียมไธโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3$)	0.04	กรัม
บรอมเครซอล เพอเพิล (Bromcresol purple)	0.02	กรัม
วุ้นผง (Agar)	15.0	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 6.7 + 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 15 นาที)

7. อาหารทดสอบการเคลื่อนที่ และการสร้างอินโดล (SIM medium)

เปปโตน (Peptone)	30.0	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	3.0	กรัม
เปปโตไนซ์ ไอรอน (Peptonized Iron)	0.2	กรัม
โซเดียมไธโอซัลเฟต (Sodium thiosulfate)	0.025	กรัม
วุ้นผง (Agar)	3.0	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.0 + 0.2

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว 121 ^{o}ซ เป็นเวลา 15 นาที)

8. อาหารทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ยูรีเอส (Urease agar)

เปปโตน (Peptone)	1.0	กรัม
เด็กซโตรส (Dextrose)	1.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.0	กรัม
โปตัสเซียมฟอสเฟต โมโนเบสิก (Potassium phosphate monobasic)	2.0	กรัม
ยูเรีย (Urea)	2.0	กรัม
ฟีนอลเรด (Phenol red)	0.012	กรัม

ละลายส่วนผสม 29.0 กรัมในน้ำกลั่น 100 มล. คนให้เข้ากัน ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง ห้ามนึ่งฆ่าเชื้อ ละลายวุ้นผง 15.0 กรัม ใน 900 มล. ของน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 121 ^{o} ซ เป็นเวลา 15 นาที) รอจนเย็น 50 – 55 ^{o} ซ จึงเติมส่วนผสมที่ผ่านการกรองแล้ว ผสมให้เข้ากัน

9. อาหารที่ใช้ในการจำแนกชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Carbohydrate fermentation medium) (Modification of MRS broth) (Sharpe, 1698)

โปรติโอสเปปโตน (Proteose peptone)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	5.0	กรัม
ไดโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
ทวีน 80 (Tween 80)	1.0	กรัม
โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate)	5.0	กรัม
ไตรแอมโมเนียมซิเตรท (tri-ammonium citrate)	2.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.58	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)	0.28	กรัม
บรอมเครซิล เพอเพิล (Bromcresol purple)	0.4	กรัม

ปรับพีเอช เป็น 6.2-6.6

เติมคาร์โบไฮเดรตที่ต้องการทดสอบลงไป 1% นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน (10 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที)

10. อาหารซิลิไนซ์ ซิสเตอีน (Selenite Cystine Broth)

ทริปโตน (Tryptone)	5.0	กรัม
แลคโตส (Lactose)	4.0	กรัม
ไดโซเดียมฟอสเฟต (Disodium phosphate)	10.0	กรัม
โซเดียม เอซิดซิลิไนซ์ (Sodium Acid Selenite)	4.0	กรัม
แอล-ซิสเตอีน (L-Cystine)	0.01	กรัม

ปรับพีเอชเป็น 7.0 + 0.2

ละลายส่วนผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันโดยการต้มเดือด ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อ

ภาคผนวก ข

1. การจำแนกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

เชี่ยเชื้อบริสุทธิ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง เอ็ม อาร์ เอส บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ 24 ชั่วโมง นำมาทดสอบสมบัติทางชีวเคมี ดังนี้

การตรวจสอบการติดสีแกรม

เชี่ยเชื้อบริสุทธ์ลงบนแผ่นสไลด์ นำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง ย้อมสีด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที เอียงสไลด์ เทสีทิ้งพร้อมทั้งหยดสารละลายไอโอดีนนาน 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง พร้อมทั้งหยดแอลกอฮอล์ 95% ล้างสีออก นาน 10-20 วินาที ล้างแผ่นสไลด์ ด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงย้อมสีด้วยสารละลาย safranin O เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจดู ลักษณะเซลล์ การจัดเรียงตัวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า

การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่เลี้ยงไว้ 18 - 24 ชั่วโมง มาเขี่ยลงบนกระดาษกรองที่หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 3 เปอร์เซ็นต์ 2 - 3 หยด ถ้าพบโคโลนีที่เกิดฟองอากาศ แสดงว่าแบคทีเรียนั้นให้ผลบวก โดยใช้ *Bacillus subtilis* ที่ได้รับจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นเชื้อควบคุมในการให้ผลการทดสอบคะตะเลสผลบวก ส่วนโคโลนีที่ไม่เปลี่ยนแปลงจะให้ผลลบ

การตรวจสอบการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลวเอ็ม อาร์ เอส บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0} ซ เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง เผา Loop ให้ร้อนแดงจุ่มลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว แบคทีเรียกลุ่ม Homofermentative bacteria จะไม่พบฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ถ้าเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Heterofermentative bacteria จะพบฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Sperber, 1976)

การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่จะทดสอบลงในอาหาร carbohydrate fermentation (ภาคผนวก ก.หมายเลข 8) ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบ คือ อะราบิโนส, เซลโลไบโอส, ฟรุคโตส, กลูโคส, กาแลคโตส, แลคโตส, มอลโตส, แมนนิทอล, แมนโนส, ไรโบส, เอสคูลิน, ราฟฟิโนส และซอร์บิตอล ใช้ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยใช้บรอมเครซิล เพอเพิล เป็นอินดิเคเตอร์ บ่มเชื้อที่ 37 ^{0} ซ ตรวจผลทุกวันโดยดูการเจริญของเชื้อ ซึ่งจะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ จากสีม่วงเป็นสีเหลืองจนครบ 7 วัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด (Total viable cell count) โดยวิธี Spread plate

วิธีนี้เป็นการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตเท่านั้น โดยการนำตัวอย่างทดสอบที่ต้องการหาจำนวนของเชื้อมาทำให้เจือจางเป็นลำดับ (1:10) ในอาหารเหลวหรือ โซเดียมคลอไรด์ 0.85% แล้วนำเชื้อในแต่ละหลอดที่มีความเจือจางต่างๆ จำนวน 0.1 มล. หยดลงบนจาน อาหารเลี้ยงเชื้อใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมปาดให้กระจายทั่วไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้จนกว่าจะแห้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ดังนี้คือ

- การตรวจนับจำนวนเชื้อประจำถิ่นใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติก ซอย บ่มที่ 37 ^{0} ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- การตรวจนับจำนวน *Lactobacillus* spp. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอ็ม อาร์ เอส บ่มที่ 37 ^{0}ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

- การตรวจนับจำนวน S. Typhimurium ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซาลโมเนลลา ชิเจลลา บ่มที่ 37 ^{0}ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. วิธีการตรวจหา S. Typhimurium จากตัวอย่างลำไส้และมูลไก่

ขั้นตอนการตรวจหา S. Typhimurium Modified จากวิธี Standard Conventional Method (BAM / AOAC / Canada / ISO) ดังนี้

ชั่งตัวอย่างลำไส้ไก่ หรือ มูลไก่ จำนวน 5.0 กรัม
เติมโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ปริมาตร 45 มล.
ทำให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน
⇓
ถ่ายเชื้อจำนวน 1 มล. ลงใน 10 มล. ของ Selenite Cysine Broth (SC)
นำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37 °ซ นาน 24 ชม.
⇓
ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซาลโมเนลลา ชิเจลลา (SS agar)
⇓
เพาะเชื้อที่ 37 °ซ นาน 18-24 ชม.
⇓
เลือกโคโลนีที่ให้ลักษณะเฉพาะของเชื้อ *Salmonella* ถ่ายลงใน
อาหารทดสอบการสร้างเอ็นไซม์ยูรีเอส (Urease agar) และ อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง
ทริปติก ซอยที่เติมสเตร็ปโตมัยซิน, คลอเตตราซัยคลิน และ เพนนิซิลลิน
ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
⇓
เลือกโคโลนีที่ให้ลักษณะเฉพาะของ S. Typhimurium strain b ถ่ายลงในอาหารเลี้ยง
เชื้อแข็งที เอส ไอ (TSI), แอล ไอ เอ (LIA)
และอาหารทดสอบการเคลื่อนที่และสร้างอินโดล (SIM)
⇓
อ่านผลในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ที เอส ไอ (TSI), แอล ไอ เอ (LIA)
และอาหารทดสอบการเคลื่อนที่และสร้างอินโดล (SIM)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย