



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาคุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ

Effect of Probiotic *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 to Microbial Community in the Broiler Chicken Intestine

นามผู้วิจัย นางสาวนันทพร พึ่งสังวร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์กมลน จิตประเสริฐ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, Ph.D.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสิงห์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ใน
ลำไส้ของไก่เนื้อ

Effect of Probiotic *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 to Microbial Community in the Broiler
Chicken Intestine

โดย

นางสาวนันทพร พึ่งสังวร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นันทพร พึ่งสังวร 2554: ผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ ปรินญาปรัชญาคุณวุฒิบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ปรชชาน กรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์สุณีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc. 134 หน้า

ศึกษาผลของอาหารที่ใส่สารเสริมในรูปของยาปฏิชีวนะ และเชื้อ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ปริมาณ $7 \log$ CFU ต่อกรัม ต่อการเปลี่ยนแปลงของขนาดวิลลัส และการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ ส่วนเจนนัมของไก่ที่อายุ 1, 3, 7, 21, 42 และ 49 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าชุดทดลองใส่เชื้อ KUB-AC5 ที่ความเข้มข้น $7 \log$ CFU ต่อกรัม ส่งเสริมให้การเจริญของวิลลัสเพิ่มขึ้นในช่วง 1-42 วัน ขณะที่ชุดควบคุมและชุดใส่ยาปฏิชีวนะ มีความสูงของวิลลัสเริ่มเพิ่มขึ้นหลังจาก 21 วัน อย่างไรก็ตามความสูงของวิลลัสของไก่โตเต็มวัย 49 วัน จากชุดทดลองใส่เชื้อ KUB-AC5 สูงกว่าชุดทดลองควบคุม และชุดทดลองใส่สารปฏิชีวนะเป็น 29.97% และ 29.17% ตามลำดับ ผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ส่วนเจนนัมโดยวิธีพีซีอาร์-ดีจีจีอีจากชุดทดลองใส่เชื้อ KUB-AC5 พบว่ามีผลต่อการลดลงของจุลินทรีย์ที่พบในไก่อายุ 1 วัน และการไม่พบกลุ่มเชื้อก่อโรค *Streptococcus pasteurianus* การตรวจพบเชื้อ *Enterococcus faecium* สันับสนุนการเพิ่มขึ้นของความสูงของวิลลัสระหว่างการเจริญในช่วง 1-42 วัน

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของลำไส้ส่วนเจนนัม ในสภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 $6 \log$ CFU ต่อลูกไก่ 1 ตัว ในระยะแรกพร้อมกับการให้อาหารที่มีเชื้อ KUB-AC5 (SIM) และสภาวะจำลองการปนเปื้อนหลังการให้อาหารที่มีเชื้อ KUB-AC5 2 วัน (SEP) ที่ระดับความเข้มข้น $5 \log$, $6 \log$ และ $7 \log$ CFU ต่อกรัม พบว่าชุดทดลองที่เสริมเชื้อ KUB-AC5 เข้มข้น $5 \log$ CFU ต่อกรัม สามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* ได้ และพบการเจริญของเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. salivarius* และ *L. reuteri* สายพันธุ์ใกล้เคียงกับ PIL73 LP970 รวมทั้ง KUB-AC5 นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบการเจริญของเชื้อ *L. reuteri* สายพันธุ์ใกล้เคียงกับ KUB-AC5 เมื่อหยุดการให้เชื้อ KUB-AC5 ในไก่อายุ 21-28 วัน ผลที่ได้สอดคล้องกับแนวโน้มการมีความสูงของวิลลัสได้สูงสุดในสภาวะดังกล่าว

ทำการวิเคราะห์กลุ่มของเชื้อโดยวิธี Phylogenetic tree จากชุดการทดลองดังกล่าวข้างต้น พบกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ 4 กลุ่ม คือ Low GC Gram positive β -Proteobacteria γ -Proteobacteria และ Actinobacteria แต่ละกลุ่มจุลินทรีย์ประกอบด้วยจีโนม และสปีชีส์ที่แตกต่างกันขึ้นกับสภาวะการทดลองนั้น ๆ

ลายมือชื่อนิติ

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Nuntaporn Pungsungvorn 2011: Effect of Probiotic *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 to Microbial Community in the Broiler Chicken Intestine. Doctor of Philosophy (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Sunee Nitisinprasert, D.Sc. 134 pages.

The effects of dietary supplementation with antibiotic and *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 with concentration of 7log CFU/g to the change of villus height and bacterial changes in jejunum of broiler comparing to the control were studied at different ages of 1, 3, 7, 21, 42 and 49 days. The results showed that the height of villus from the treatments of KUB-AC5 addition increased from d 1 to d 42 chick while the ones of control and antibiotic treatments started to increase after 21 d. However, the villus height of 49 d chick from KUB-AC5 treatment were higher than the control and antibiotic treatment for 29.97% and 29.17%, respectively. Considering to microbial community in jejunum of chick by PCR-DGGE, the supplement of KUB-AC5 affected the reduction of various specie number detected from chick 1 d and growth inhibition of *Streptococcus pasteurianus*. The existing of *Enterococcus faecium* detected would support the increment of villus high during 1-42 d.

The effects of dietary supplementation with 5log, 6log, 7log CFU/g of KUB-AC5 on villus height and bacterial changes in two model of broiler chickens contaminated with *Salmonella* Enteritidis S003 of 6log CFU per chick by the same time as experimental feeding (SIM) and after two days experimental feeding (SEP). The results showed that 5 logCFU/g of KUB-AC5 treatment affected the growth inhibition of *Salmonella*. While abundance of *Lactobacillus acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. salivarius* and *L. reuteri* belonging to the similar strains of PIL73, LP970 including KUB-AC5 had occurred. In addition, *L. reuteri* was also detected even the strain KUB-AC5 did not supplemented during 21-28 d. This would support the highest of villus height obtained.

By phylogenetic tree analysis of these treatments, 4 different bacterial groups of Low GC Gram positive, β -Proteobacteria, γ -Proteobacteria and Actinobacteria were detected. Different genus or specie of each bacterial group found depended on their treatment condition.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุณีย์ นิธิสินประเสริฐ ประธาน
กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญแข วันไชยชนวงศ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์
ดร. ภคมน จิตประเสริฐ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ที่ให้คำแนะนำในการเรียน การวิจัย ตลอดจน
การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.
อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้
สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐชนก อมรเทวภัทร ที่ให้คำแนะนำในการวาง
แผนการวิจัย

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนทุนจากสภาวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2546
และทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท-เอก จากบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2548 และขอขอบพระคุณสถาบันสุวรรณวาทก-
กสิกิจ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ทำการ
ทดลองเลี้ยงไก่

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่เป็น
กำลังใจและสนับสนุนข้าพเจ้าตลอดมา

นันทพร พึ่งสังวร
มีนาคม 2554

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	21
อุปกรณ์	21
วิธีการ	23
ผลและวิจารณ์	31
สรุป	106
ข้อเสนอแนะ	108
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	109
ภาคผนวก	121
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	134

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE	13
2	ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในไอเลียมและไส้ตันของไก่	15
3	วัตถุดิบและส่วนประกอบโภชนะของอาหารทดลองน้ำหนักรวม 100 กิโลกรัม	22
4	ชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเจล DGGE	29
5	ผลการเจริญเติบโตของไก่ที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม อาหารผสม ยาปฏิชีวนะ และอาหารผสมโปรไบโอติก <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 ในช่วงอายุ 1-49 วัน	34
6	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และ กลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 อายุ 1 วัน	40
7	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และ กลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 อายุ 3 วัน	42
8	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และ กลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 อายุ 7 วัน	44
9	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และ กลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 อายุ 21 วัน	46
10	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และ กลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 อายุ 42 วัน	48
11	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และ กลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 อายุ 49 วัน	50
12	ผลการเจริญเติบโตของไก่ที่ให้โปรไบโอติก <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ <i>Salmonella</i> Enteritidis S003 2 แบบ	56
13	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM อายุ 1 วัน	82
14	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM อายุ 7 วัน	83
15	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM อายุ 14 วัน	84
16	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM อายุ 21 วัน	85
17	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM อายุ 28 วัน	87

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
18	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SEP อายุ 1 วัน	88
19	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SEP อายุ 7 วัน	89
20	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SEP อายุ 14 วัน	90
21	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SEP อายุ 21 วัน	91
22	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SEP อายุ 28 วัน	92
24	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM และ SEP อายุ 7 วัน	94
25	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM และ SEP อายุ 14 วัน	95
26	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM และ SEP อายุ 21 วัน	97
27	จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM และ SEP อายุ 28 วัน	98

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ระบบทางเดินอาหารของไก่	5
2	วิลลัสและคริปต์ของเยื่อบุลำไส้เล็ก	6
3	จุลินทรีย์ที่พบในระบบทางเดินอาหารของไก่	14
4	ปริมาณอาหารที่กิน (Feed intake) ของไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5	32
5	น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (BW gain) ของไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5	33
6	อัตราการเปลี่ยนอาหาร (FCR) ของไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5	33
7	ความสูงของวิลลัสในลำไส้ส่วนเจจุน้ำมของไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5	35
8	ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้ส่วนเจจุน้ำมของไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5	37
9	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ส่วนเจจุน้ำมของไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5	37
10	PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 อายุ 1 วัน	39
11	PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 อายุ 3 วัน	41
12	PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 อายุ 7 วัน	43

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 อายุ 21 วัน	45
14	PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 อายุ 42 วัน	47
15	PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 อายุ 49 วัน	49
16	Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในตัวอย่างลำไส้กลุ่มควบคุม ช่วงอายุ 1-49 วัน	51
17	Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในตัวอย่างลำไส้กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ ช่วงอายุ 1-49 วัน	52
18	Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในตัวอย่างลำไส้กลุ่มที่ให้โปรไบโอติก 10^7 cfu ต่อกรัม ช่วงอายุ 1-49 วัน	52
19	ปริมาณอาหารที่กิน (Feed intake) ของไก่กลุ่ม SIM	54
20	น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (BW gain) ของไก่กลุ่ม SIM	55
21	อัตราการเปลี่ยนอาหาร (FCR) ของไก่กลุ่ม SIM	55
22	ปริมาณอาหารที่กิน (Feed intake) ของไก่กลุ่ม SEP	57
23	น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (BW gain) ของไก่กลุ่ม SEP	57
24	อัตราการเปลี่ยนอาหาร (FCR) ของไก่กลุ่ม SEP	58
25	ผลการเจริญเติบโตของไก่กลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 10^5 CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ <i>Salmonella</i> Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP	60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
26	ผลการเจริญเติบโตของไก่อกลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 10^6 CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ <i>Salmonella</i> Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP	61
27	ผลการเจริญเติบโตของไก่อกลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 10^7 CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ <i>Salmonella</i> Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP	62
28	ความสูงของวิลลัสในไก่อกลุ่ม SIM	64
29	ความสูงของวิลลัสในไก่อกลุ่ม SEP	64
30	ความสูงของวิลลัสในไก่อกลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 10^5 CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ <i>Salmonella</i> Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP	65
31	ความสูงของวิลลัสในไก่อกลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 10^6 CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ <i>Salmonella</i> Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP	65
32	ความสูงของวิลลัสในไก่อกลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 10^7 CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ <i>Salmonella</i> Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP	66
33	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในไก่อกลุ่ม SIM	67
34	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในไก่อกลุ่ม SEP	68
35	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในไก่อกลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 10^5 CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ <i>Salmonella</i> Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP	68

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
36	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในไก่กลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 10^6 CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ <i>Salmonella</i> Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP	69
37	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในไก่กลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 10^7 CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ <i>Salmonella</i> Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP	69
38	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในไก่กลุ่ม SIM	71
39	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในไก่กลุ่ม SEP	71
40	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในไก่กลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 10^5 CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ <i>Salmonella</i> Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP	72
41	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในไก่กลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 10^6 CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ <i>Salmonella</i> Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP	72
42	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในไก่กลุ่มที่ให้ <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5 10^7 CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ <i>Salmonella</i> Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP	73
43	PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่หลังจากพักและก่อนการได้รับอาหาร	74
44	PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม (CON-SIM)	75
45	PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม SIM และ SEP อายุ 1 วัน	76

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
46	PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม SIM และ SEP อายุ 7 วัน	77
47	PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม SIM และ SEP อายุ 14 วัน	78
48	PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม SIM และ SEP อายุ 21 วัน	79
49	PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม SIM และ SEP อายุ 28 วัน	80
50	Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดง ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม ควบคุม ช่วงอายุ 1-28 วัน	99
51	Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดง ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม LAB- 10^5 -SIM ช่วงอายุ 1-28 วัน	100
52	Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดง ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม LAB- 10^5 -SEP ช่วงอายุ 1-28 วัน	101
53	Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดง ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม LAB- 10^6 -SIM ช่วงอายุ 1-28 วัน	101
54	Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดง ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม LAB- 10^6 -SEP ช่วงอายุ 1-28 วัน	102
55	Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดง ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม LAB- 10^7 -SIM ช่วงอายุ 1-28 วัน	102

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
56	Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม LAB-10 ⁷ -SEP ช่วงอายุ 1-28 วัน	103



ผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ต่อการเปลี่ยนแปลงของ จุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ

Effect of Probiotic *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 to Microbial Community in the Broiler Chicken Intestine

คำนำ

ความต้องการอาหารและแหล่งโปรตีนมีเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณประชากรโลกที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ไก่เนื้อจัดเป็นเนื้อสัตว์ซึ่งสามารถผลิตได้ในระยะเวลาสั้นจึงมีความต้องการเพื่อการบริโภคเป็นปริมาณมาก ด้วยเหตุนี้อุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกของประเทศไทยจึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีเกี่ยวกับการผลิต การควบคุม การป้องกันและการกำจัดโรค เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตให้ได้ตามมาตรฐานและข้อบังคับในการส่งออกสินค้า รวมถึงการแข่งขันด้านคุณภาพและราคากับประเทศคู่แข่งในการส่งออกผลิตภัณฑ์ไก่เนื้ออยู่ตลอดเวลา อีกทั้งในปี พ.ศ. 2549 ได้มีการกำหนดระเบียบข้อบังคับของกลุ่มประเทศคู่ค้าที่สำคัญในการยกเลิกการใช้สารปฏิชีวนะเพื่อกระตุ้นสมรรถภาพการผลิตของไก่เนื้อ เนื่องจากผลการตกค้างของสารปฏิชีวนะในเนื้อไก่ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค อุตสาหกรรมผลิตไก่เนื้อจึงต้องหาแนวทางหรือผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่จะนำมาใช้ทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะ เช่น การใช้สารกลุ่มพรีไบโอติกและการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติก กรดอินทรีย์ และสมุนไพร เป็นต้น

จุลินทรีย์โปรไบโอติกซึ่งแต่เดิมเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมนมเป็นส่วนใหญ่ ในปัจจุบันได้มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีรายงานการศึกษาพบว่าผลในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของสัตว์ ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในตัวสัตว์ได้เพิ่มมากขึ้น และทำให้สัตว์มีสุขภาพดีและสามารถใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะได้ สำหรับจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ในอาหารมนุษย์นั้นส่วนใหญ่เป็นกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* จึงมีการศึกษาการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกกลุ่มนี้ในการเลี้ยงไก่เพื่อความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาใช้ในการเลี้ยงไก่และพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคบางชนิดได้ เช่น *Salmonella typhimurium* *Salmonella gallinarum*

Escherichia coli และ *Clostridium perfringens* ได้ โดยการใช้งานเป็นการผสมแบคทีเรียกรดแลคติกในรูปของการแช่แข็งแห้ง หรือในรูปของผงแห้งลงไปในการปรุงอาหารไก่ ในปัจจุบันได้มีการศึกษารูปแบบของการเตรียมเชื้อด้วยเทคนิคที่ช่วยยืดอายุของการเก็บรักษาเชื้อ และการคงประสิทธิภาพการเป็นโปรไบโอติกให้ดีขึ้นอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพื่อตรวจติดตามผลการใช้งานโปรไบโอติกในตัวสัตว์ เช่น การศึกษาการยึดเกาะของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร การเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ในตัวสัตว์ และผลของโปรไบโอติกต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร แต่การตรวจติดตามโดยการใช้วิธีการที่อาศัยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (culture dependent method) ยังคงมีปัญหาเนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดมีความต้องการสภาวะและสารอาหารที่เฉพาะในการเจริญจึงไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ ซึ่งจุลินทรีย์ดังกล่าวอาจจะเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในระบบทางเดินอาหาร จึงได้มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุล (culture independent method) เข้ามาใช้งาน โดยการใช้เทคนิค PCR-DGGE ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจติดตามกลุ่มจุลินทรีย์ได้ทุกประเภท ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ รา รวมทั้งไซยาโนแบคทีเรีย จึงนำมาใช้ติดตามจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ จุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม จุลินทรีย์ในกระบวนการหมักต่าง ๆ รวมทั้งการหาการกลายพันธุ์ของยีนในทางการแพทย์ได้

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของจุลินทรีย์โปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ต่อการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของวิลลัส และศึกษาผลของจุลินทรีย์โปรไบโอติกต่อจุลินทรีย์ภายในลำไส้ของไก่เนื้อ โดยการตรวจติดตามด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล PCR-DGGE รวมถึงการตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งจากผลการศึกษาที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาการผลิตจุลินทรีย์โปรไบโอติกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาเปรียบเทียบผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 และยาปฏิชีวนะต่อการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของวิลด์สภายในลำไส้ และการเปลี่ยนแปลงชนิดของจุลินทรีย์ในลำไส้ด้วยเทคนิค PCR-DGGE

2. ศึกษาเปรียบเทียบผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ต่อการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของวิลด์สภายในลำไส้ และการเปลี่ยนแปลงชนิดของจุลินทรีย์ในลำไส้ด้วยเทคนิค PCR-DGGE ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 2 แบบ

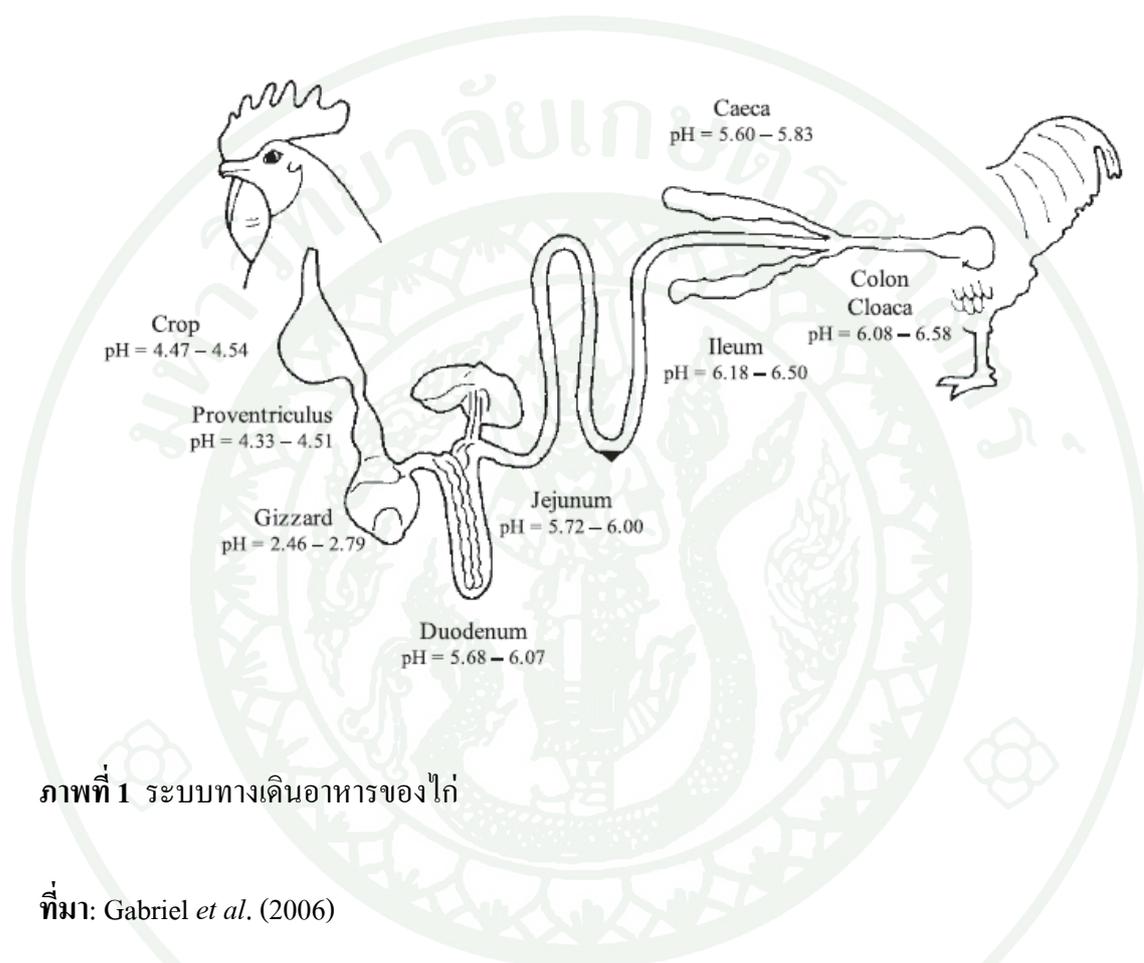
การตรวจเอกซเรย์

1. ระบบทางเดินอาหารของไก่

ระบบทางเดินอาหารของไก่เริ่มต้นจากหลอดอาหารจนถึงทวารดังแสดงในภาพที่ 1 ส่วนของหลอดอาหาร (esophagus) เป็นต่อจากลำคอไปถึงกระเพาะพัก (crop) ซึ่งหลอดอาหารจะเป็นส่วนที่มีผนังบางและยืดหดได้ ในไก่ที่โตเต็มวัยจะมีความยาวประมาณ 15-20 เซนติเมตร สำหรับการเคลื่อนของอาหารผ่านหลอดอาหารจะมีน้ำเมือกที่ผลิตจากต่อมที่ผนังของหลอดอาหารช่วยในการเคลื่อนที่ โดยหลอดอาหารส่วนหน้าจะหดตัว ทำให้เกิดการหดตัวแบบ peristaltic ทุก ๆ 15 วินาที และในหลอดอาหารส่วนหลังจะหดตัวทุก ๆ 50-55 วินาที จากนั้นอาหารจะเข้าสู่กระเพาะพักซึ่งเป็นส่วนของหลอดอาหารที่ขยายออกก่อนที่จะผ่านเข้าสู่ช่วงอก ทำหน้าที่เก็บอาหารชั่วคราวเมื่อกระเพาะบดเต็ม โดยพบว่าอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตจะถูกย่อยโดยเอนไซม์อะไมเลส (amylase) ที่หลั่งออกมาจากเยื่อของกระเพาะพักและจากต่อมน้ำลาย หลังจากนั้นจะถูกส่งเข้าสู่ส่วนของกระเพาะอาหาร ซึ่งแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ กระเพาะแท้ (glandular stomach หรือ proventriculus) และ กระเพาะบด (muscular stomach หรือ gizzard หรือ ventriculus)

กระเพาะแท้มีรูปร่างคล้ายกระสวย มีเยื่อของชั้นเยื่อเมือกชนิด simple columnar epithelium โดยมี gastric glands แทรกกระจายอยู่ทั่วไป ประกอบด้วย oxynticopeptic cells ทำหน้าที่หลั่งกรดเกลือและเปปซิน (pepsin) ออกมาย่อยอาหาร และ chief cells ซึ่งภายในไซโตพลาสซึมพบ zymogen หรือ pepsinogen granules ในจำนวนที่แตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับสภาวะการย่อยอาหาร สำหรับกระเพาะบดเป็นส่วนของกล้ามเนื้อเรียบที่แข็งแรงและหนา 2 มัด ช่วยทำให้เกิดการบดอาหารที่แข็งได้ โดยมีก้อนกรวดมาช่วยเสริมหน้าที่ในการบดอาหาร

ลำไส้เล็ก (small intestine) เป็นอวัยวะที่สำคัญในการย่อยอาหารและดูดซึมอาหาร ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ดูโอดินัม (duodenum) เจจูนัม (jejunum) และไอเรียม (ileum) ในไก่โตเต็มวัยจะมีความยาวประมาณ 120 เซนติเมตร โดยลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัมยาวประมาณ 30 เซนติเมตร เป็นท่อรูปตัวยู อยู่ทางด้านขวาของกระเพาะบด ภายในมี goblet cell จำนวนมาก ทำหน้าที่ขับเมือกและบริเวณส่วนปลายมีท่อเปิดเข้าจากตับและตับอ่อน ส่วนเจจูนัมยาวประมาณ 85-120 เซนติเมตร และไอเรียมยาวประมาณ 16 เซนติเมตร มีลักษณะเป็นบ่วงคล้ายรูปตัวยู โดยส่วนปลายของเจจูนัมจะมีติ่งขนาดเล็กและสั้น ซึ่งเป็นถุงปลายตันของ yolk stalk เรียกว่า vitelline (Meckel's) diverticulum หรือ remnant of yolk stalk ใช้เป็นตำแหน่งในการแบ่งลำไส้

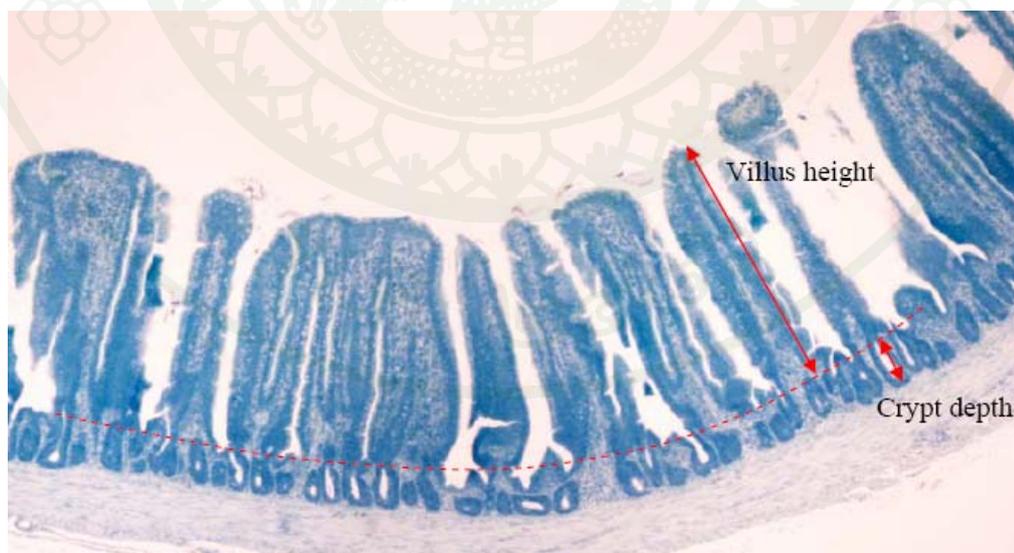


ภาพที่ 1 ระบบทางเดินอาหารของไก่

ที่มา: Gabriel *et al.* (2006)

ลำไส้ใหญ่ (large intestine) ประกอบด้วยไส้ตัน (cecum) และลำไส้ใหญ่ตรง (rectum) โดยไส้ตันมีความยาวประมาณ 15-25 เซนติเมตร ทำหน้าที่บรรจุอาหารที่ยังย่อยไม่สมบูรณ์ซึ่งมีลักษณะเปียกและนุ่ม โดยจะช่วยดูดซึมน้ำกลับเข้าสู่ระบบเลือดดำ ช่วยย่อยอาหารคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนที่เหลือจากกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กได้เล็กน้อย และพบการย่อยอาหารเชื้อย โดยแบคทีเรีย สำหรับลำไส้ใหญ่ตรงมีความยาวประมาณ 165-170 เซนติเมตร ทำหน้าที่ดูดซึมน้ำและอิเล็กโทรไลต์ และมีการหดตัวแบบ peristalsis เพื่อนำอาหารที่ย่อยแล้วไปยังส่วนทวาร (cloaca) ซึ่งเป็นส่วนปลายสุดของท่อทางเดินอาหารที่ทำหน้าที่ในการเก็บอุจจาระและปัสสาวะ (วิโรจน์, 2538)

ลักษณะวิทยาของวิลลัสภายในลำไส้เล็กของไก่โครงสร้างของส่วนเยื่อบุผิวมีวิลลาในลำไส้เล็กของไก่จะมีการพัฒนาทันทีเมื่อไก่ได้รับอาหารหลังฟักออกจากไข่ เพื่อทำการย่อยและดูดซึมสารอาหารต่าง ๆ ในอาหาร ภายหลังจากฟัก 2 วัน มีการเจริญเติบโตของวิลลัสอย่างรวดเร็วในลำไส้เล็กทุกส่วน ซึ่งเป็นผลมาจากการผลิตเซลล์จากส่วนคริปต์ ส่วนของคริปต์จะบุด้วยเซลล์หลายชนิด โดยเซลล์ชนิด undifferentiated จะแบ่งตัวแล้วเคลื่อนย้ายไปสู่ส่วนปลายของวิลลัส และเจริญเป็นเซลล์ดูดซึม (Absorptive cell) และเซลล์หลั่งน้ำเมือก (Goblet cell) เพื่อแทนที่เซลล์เก่าที่ลอกหลุดหรือถูกทำลายไปในส่วนลูเมน สำหรับอัตราการพัฒนาของลำไส้เล็กจะไม่สม่ำเสมอตลอดทั้งลำไส้ โดยส่วนคูโอดินัมจะพัฒนาสมบูรณ์ภายใน 7 วัน สำหรับเจจุนัมและโอดิเทียมจะพัฒนาต่อไปจนสมบูรณ์เมื่อไก่อายุ 14 วัน (สุวรรณ, 2548) ในไก่กระทงพบว่าวิลลัสมีขนาดใหญ่และพบการหลุดลอกของเซลล์อย่างสม่ำเสมอ แสดงถึงการมีอัตราการผลิตเซลล์ทดแทนที่สูง (Yamauchi and Isshiki, 1991) การประเมินการพัฒนาพิจารณาจากความสูงของวิลลัส ความลึกของคริปต์ และอัตราส่วนระหว่างความสูงของวิลลัสและความลึกของคริปต์ ดังแสดงในภาพที่ 2 นอกจากนี้ยังพิจารณาได้จากรูปร่าง และการจัดเรียงตัวของวิลลัสที่แตกต่างกันได้ด้วย Jeurissen *et al.* (2002) พบว่าไก่ที่กินอาหารที่ประกอบด้วยข้าวโพดและแป้งถั่วเหลืองจะมีวิลลัสรูปร่างคล้ายใบไม้และเรียงตัวแบบ zigzag ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่วิลลัสมีรูปร่างคล้ายนิ้วมือ และพบว่ารูปร่างของวิลลัสมีผลต่อประสิทธิภาพการดูดซึมสารอาหารของวิลลัส โดยวิลลัสรูปร่างคล้ายนิ้วมือจะมีประสิทธิภาพการดูดซึมสารอาหารได้ดีกว่ารูปร่างที่มีปลายทู่



ภาพที่ 2 วิลลัสและคริปต์ของเยื่อบุลำไส้เล็ก

ที่มา: Sun (2004)

ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาวิลลัสในระบบทางเดินอาหารของไก่ ได้แก่ ชนิดของอาหาร จุลินทรีย์โปรไบโอติก ลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหาร และการหยุดให้อาหาร (feed withdrawal)

Sun *et al.* (2005) ศึกษาผลของอาหารต่อความสูงของวิลลัสในลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัม และไอเรียม โดยสูตรอาหาร ได้แก่ NC คือ อาหาร basal diet PC คือ อาหาร basal diet ผสม ยาปฏิชีวนะ lincomycin PG1 คือ อาหาร basal diet ผสม เอนไซม์จากพืช (Veg Pro) แอนติไมโค ทอกซิน (MTB-100) แมนแนนโพลิโกแซคคาไรด์ (Bio-Mos) จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ ประกอบด้วย *Lactobacillus Enterococcus* และ *Pediococcus* (All-Lac XCL) และ Acid-Pak 4-way ซึ่งประกอบด้วยกรดซิตริก กรดซอร์บิก *Lactobacillus Streptococcus* และ สารอิเล็กโทรไลต์ ได้แก่ Na^+ K^+ Zn^{2+} Fe^{2+} และ Mn^{2+} และ PG2 อาหาร basal diet ผสม Bio-Mos และ All-Lac XCL พบว่าในช่วงอายุ 35- 49 วัน ไก่ที่ให้อาหารสูตร PG2 มีความสูงของวิลลัสในลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัมคงที่ และส่วนไอเรียมเพิ่มขึ้นได้ แต่ไก่ที่ให้อาหารสูตรอื่นมีความสูงของวิลลัสลดลง และที่อายุ 49 วัน กลุ่ม PG2 มีความสูงของวิลลัสมากที่สุด ในลำไส้ทั้งสองส่วน แสดงถึงการส่งเสริมความสูงของวิลลัสโดยฟรีไบโอติกร่วมกับโปรไบโอติก

Yamauchi *et al.* (1993) พบว่าเมื่อให้อาหารที่มีโปรตีนปริมาณมากและพลังงานต่ำจะทำให้วิลลัสของไก่กระตมขนาดใหญ่มากกว่าการได้รับอาหารที่มีปริมาณโปรตีนน้อยและพลังงานสูง

Yasar and Forbes (1999) พบว่าไก่ที่ให้อาหารเปียก (wet diet) มีความสูงของวิลลัสในลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัมและไอเรียม ไล่ต้น และลำไส้ใหญ่มากกว่าไก่ที่ให้อาหารแห้ง (dry diet) ซึ่งแสดงว่ารูปแบบของอาหารที่ให้มีผลต่อความสูงของวิลลัสได้

Tarachai and Yamauchi (2000) ศึกษาผลของการหยุดอาหารต่อความสูงของวิลลัสในลำไส้ส่วนดูโอดินัมของไก่อายุ 142 วัน พบว่าการหยุดให้อาหารเป็นเวลา 5 วันจะมีความสูงของวิลลัสลดลง แต่การหยุดให้อาหาร 3 วัน และกลับมาให้อาหาร 2 วัน พบว่าไม่มีผลต่อความสูงของวิลลัส แสดงว่าระยะเวลาการหยุดให้อาหารมีผลต่อความสูงของวิลลัสและวิลลัสสามารถฟื้นตัวกลับสู่สภาวะเดิมได้เมื่อได้รับอาหารใหม่อีกครั้ง

2. โพรไบโอติก

โพรไบโอติก (Probiotics) เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตใช้เสริมในอาหาร เพื่อประโยชน์ทางสุขภาพของผู้บริโภคหรือสิ่งมีชีวิตที่จุลินทรีย์นั้นอาศัยอยู่ มีบทบาทในการเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพสัตว์เมื่อได้รับในปริมาณที่เหมาะสม ก่อให้เกิดประโยชน์โดยช่วยให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ซึ่งจัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Recognised as safe (GRAS) bacteria) ได้รับการยอมรับในการใช้งานอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่ดี ได้แก่ เป็นสายพันธุ์ที่ให้ประโยชน์ต่อสัตว์ เช่น ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต หรือต้านทานต่อโรค ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรค โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกและองค์ประกอบของเซลล์รวมทั้งผลิตภัณฑ์ของเซลล์ต้องไม่สร้างปฏิกิริยาที่เป็นพิษต่อสัตว์ สามารถควบคุมหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อโรคได้ มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วในลำไส้ มีความสามารถยึดเกาะกับผนังลำไส้ ทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ในระบบทางเดินอาหารได้ดี เช่น ทนต่อน้ำดี น้ำย่อย และสภาพกรดในกระเพาะอาหาร สามารถสร้างสารปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคได้ มีลักษณะทางพันธุกรรมคงที่ เพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และลดคอเลสเตอรอลในเลือดได้ (Fuller, 1992; Bayane *et al.*, 2006)

2.1 โพรไบโอติกแบคทีเรียกรดแลคติก

โพรไบโอติกแบคทีเรียกรดแลคติกใช้ผสมในอาหารสัตว์เพื่อประโยชน์ในการส่งเสริมสุขภาพในสัตว์หลายชนิด เช่น ไก่ หมู และสุนัข เมื่อเข้าสู่ร่างกายสัตว์แบคทีเรียกรดแลคติกจะสามารถเพิ่มจำนวนและเข้าไปยึดเกาะกับผนังกระเพาะพัก ลำไส้เล็ก และ ลำไส้ใหญ่ (Gusils *et al.*, 2002) โดยพบการยึดเกาะได้มากที่สุดในส่วนของลำไส้เล็ก (Pascual *et al.*, 1999; Gopal *et al.*, 2001) จากการศึกษาของ Gusils *et al.* (1999) พบว่า *Lactobacillus animalis* สามารถยับยั้งการยึดเกาะกับอวัยวะที่เลียนเซลล์ของลำไส้ของ *Salmonella pullorum* *Salmonella* Enteritidis และ *Salmonella gallinarum* ได้ 90% 88% และ 78% ตามลำดับ และ *Lactobacillus fermentum* สามารถยับยั้งการยึดเกาะของ *Salmonella pullorum* ได้ 77% โดยความสามารถในการยึดเกาะ (adhesion) ของเซลล์ *Lactobacillus* กับผนังลำไส้จะขึ้นอยู่กับปริมาณของกรดไทโคอิก และพอลิแซคคาไรด์ (Schneitz *et al.*, 1993) สมบัติทางไฟฟ้า การยึดเหนี่ยวกันด้วยแรงแวลเดอร์วาลส์ (van der Waals force) และสมบัติไม่ชอบน้ำของผนังเซลล์ โดยพบว่า *Lactobacillus*

fermentum ssp. *cellobiosus* มีสมบัติไม่ชอบน้ำสูงจึงทำให้มีความสามารถในการยึดเกาะกับอพิทิลเลียนเซลล์ได้ดี และใน *Lactobacillus* บางชนิด เช่น *Lactobacillus animalis* และ *Lactobacillus fermentum* พบการสร้างเลกติน (lectins) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ช่วยในการยึดเกาะกับอพิทิลเลียนเซลล์ได้ (Henriksoon *et al.*, 1991; Reid *et al.*, 1999; Edelman *et al.*, 2002; Gusils *et al.*, 2002;) นอกจากนี้ความสามารถในการยึดเกาะแล้ว *Lactobacillus* บางสายพันธุ์ยังสามารถผลิตกรด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียโอซิน ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ (Casas and Dobrogosz, 2000) ช่วยรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ และมีบทบาทในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันให้เพิ่มขึ้นด้วย (Ouwehandy *et al.*, 1999; Rinkinen *et al.*, 2003; Servin and Coconnier, 2003)

Lactobacillus reuteri เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์หลายชนิด เช่น หนู ไก่ ไก่วง หมู และสัตว์เลี้ยงบางชนิด นอกจากนี้ยังพบได้ในน้ำนมมนุษย์ หมูและวัว (Casas *et al.*, 1998) ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่พบในแต่ละแหล่งจะมีความแตกต่างกัน แต่มีลักษณะทางสรีรวิทยาและพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน *Lactobacillus reuteri* จัดอยู่ในกลุ่ม obligate heterofermentative enterolactobacilli และเป็นชนิดเดียวเท่านั้นในกลุ่มที่สามารถผลิตและปล่อยสารตัวกลางเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ออกนอกเซลล์ได้ พบการผลิต reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะไร้อากาศ ในอาหารที่มีกลูโคสและกลีเซอรอล หรือกลีเซอรอลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบ และจะต้องมีโคเอนไซม์ B12 ร่วมด้วยเสมอ (Ouwehand, 1999) reuterin ที่ผลิตได้จัดเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (low molecular weight antimicrobial substances) สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา และโปรโตซัว จึงมีการประยุกต์ใช้โดยเติม reuterin หรือจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิต reuterin ในอาหารของมนุษย์และสัตว์เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคและการนำเสียขณะเก็บรักษา (Daeschel, 1989) สำหรับการใช้เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีก พบว่า *Lactobacillus reuteri* ช่วยส่งเสริมให้มีประสิทธิภาพของการผลิตได้สูงขึ้น และสามารถใช้ทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะได้เป็นอย่างดี โดยมีการเพิ่มจำนวนได้ดีในลำไส้ไก่ มีบทบาทในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไก่ และช่วยรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารทำให้ไก่มีความต้านทานต่อโรคได้เพิ่มขึ้น

Nitisinprasert *et al.* (2000) แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ไก่ พบว่า *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 KUB-AC16 และ KUB-AC21 สามารถผลิตสารที่มีลักษณะคล้ายแบคทีเรียโอซิน ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (bacteriocin-like inhibitory

substances) *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ชนิดที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ amoxicillin colistin kanamycin neomycin erythromycin gentamycin chloramphenicol tetracycline penicillin และ streptomycin จากการศึกษาของ Sukyai (2003) พบว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคมือถือประกอบที่เป็นสารโปรตีนและส่วนที่ไม่ใช่สารโปรตีน และจากการศึกษาของ Nitisinprasert *et al.* (2004a) พบว่า *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 สามารถผลิตสาร KAC5 มีโครงสร้างเป็นโปรตีนและมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคกลุ่มที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษได้

Nitisinprasert *et al.* (2004b) ศึกษาความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์จุลินทรีย์กับเมือกจากลำไส้ไก่ โดยใช้เทคนิคทางจุลชีววิทยาในการตรวจสอบปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ที่ยึดเกาะกับสารละลายเมือกภายในหลอด E-tube พบว่า *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 และ *Lactobacillus acidophilus* KV-1 มีความสามารถในการยึดเกาะ 21.6 % และ 23.1 % ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อก่อโรค *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. 2-8 เท่า

2.2 การผลิตจุลินทรีย์โปรไบโอติก

การเตรียมเซลล์จุลินทรีย์โปรไบโอติกเพื่อการใช้งานทำได้โดยการเตรียมเป็นแบบผงแห้งแบบพ่นฝอย (spray dried) การแช่แข็งแห้ง (freeze-dried) และการแช่แข็ง (frozen) ที่เติมกลีเซอรอล หรือสคิมมิลด์ (Pascual *et al.*, 1999; Tannock *et al.*, 2000) และการเตรียมโดยการห่อหุ้มเซลล์ ซึ่งพบว่าช่วยยืดอายุการเก็บรักษาและทำให้เซลล์มีชีวิตรอดเมื่อเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ได้ดีขึ้น

การห่อหุ้มเซลล์ (microencapsulation) ด้วยอัลจินตเป็นเทคนิคที่นำมาใช้เพื่อเตรียมเซลล์สำหรับผสมในอาหารเสริมสุขภาพ “Probiotic health food” เช่น ในผลิตภัณฑ์นม โยเกิร์ต และจากการที่สถาบัน International dairy federation ได้กำหนดให้ผลิตภัณฑ์นมเสริมโปรไบโอติกควรมีจุลินทรีย์โปรไบโอติกอย่างต่ำ 10^7 CFU ต่อกรัมของผลิตภัณฑ์ แต่พบว่าผลิตภัณฑ์ในรูปแบบเดิมที่ผสมเซลล์จุลินทรีย์โดยตรงมีการตายของจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษาสูง และจุลินทรีย์ไม่ทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ซึ่งมีความเป็นกรดและค่า pH สูง ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำเทคนิคการห่อหุ้มเซลล์มาใช้ พบว่าเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มสามารถมีชีวิตรอดและเจริญได้ในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูงและทนต่อเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูงในระบบ

ทางเดินอาหารได้ โดยมีการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus acidophilus* CSCC 2400 และ CSCC 2409 ด้วยอัลจินต และทำการทดสอบการมีชีวิตรอดที่พีเอช 2.0 พบว่าเซลล์มีปริมาณลดลง 2-3 log cycle และในสถานะที่มีความเข้มข้นของเกลือ น้ำดี 1% มีปริมาณเซลล์ลดลง 0.3-0.5 log cycle เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการห่อหุ้ม พบว่าสามารถรอดชีวิตได้สูงกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการห่อหุ้มอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากอัลจินตมีการพอร์มในลักษณะที่เป็นเมทริกซ์ห่อหุ้มเซลล์จึงสามารถปกป้องเซลล์จากสภาวะที่รุนแรงได้ และเมื่อเข้าสู่ลำไส้จะเกิดการแลกเปลี่ยนประจุแคลเซียมซึ่งจะทำให้โครงสร้างของแคปซูลสลายออก จึงเกิดการปลดปล่อยเซลล์จุลินทรีย์ออกมาได้ (Sultana *et al.*, 2000; Chandramouli *et al.*, 2004)

3. การติดตามการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร

การตรวจติดตามจุลินทรีย์สามารถทำได้หลายวิธี ในการตรวจหาจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของไก่โดยวิธีการที่ต้องอาศัยการเจริญของจุลินทรีย์ (culture-dependent method) พบว่าจุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เนื่องจากมีความต้องการสารอาหารที่มีความเฉพาะในการเจริญ จากการศึกษาของ Salanitro *et al.* (1974) พบว่าจุลินทรีย์บางชนิดที่คัดแยกจากลำไส้ของไก่ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีโครงสร้างซับซ้อน (complex medium) ได้ และบางชนิดใช้เวลานานในการเพาะเลี้ยง จึงทำให้การทำงานวิจัยเพื่อการตรวจติดตามที่ต้องการผลที่รวดเร็วนั้นทำได้ยาก ในปัจจุบันจึงได้มีการนำวิธีการที่ไม่อาศัยการเจริญของจุลินทรีย์ (culture-independent method) มาใช้ เช่น การสร้างตัวติดตาม 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA Reverse transcriptase PCR analysis Fluorescent in situ hybridization (FISH) (Tannock *et al.*, 2000) Genus-specific PCR (Satokari *et al.*, 2001) TTGE (temperature gradient gel electrophoresis) (Zhu *et al.*, 2002) SSCP (single-strand conformation polymorphism) (Hori *et al.*, 2006) และ DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) (Knarreborg *et al.*, 2002)

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) เป็นเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสที่ใช้ในการวิเคราะห์หาความแตกต่างของปริมาณและชนิดของเบสในชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจ โดยพิจารณาจากผลการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอบนเจลที่มีสารดีนาทูแรนต์ผสมอยู่ ซึ่งความสามารถในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนเจลจะอาศัยค่า melting temperature (Tm) ที่ต่างกัน โดยค่า Tm จะขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของเบสที่เป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเอในบริเวณนั้น (melting domain) ระบบเกรเดียนต์ของ DGGE เกิดจากการผสมระหว่างอุณหภูมิในช่วง 50 - 65 องศาเซลเซียส และ

linear denaturant gradient โดยที่สารละลายดีเนทูแรนท์ 100% ประกอบด้วยยูเรีย 7 โมลาร์ และฟอร์มาไมด์ 40% ทิศทางการทำเกรเดียนต์ทำได้ทั้งในแนวตั้งฉากและแนวนานกับอเล็กโตรโฟรีซิส สำหรับการทำเกรเดียนต์ช่วงกว้าง เช่น 0 - 100% จะทำเกรเดียนต์ในทิศทางตั้งฉากกับอเล็กโตรโฟรีซิส ส่วนการทำเกรเดียนต์ช่วงแคบจะทำเกรเดียนต์ในทิศทางขนานกับอเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งมีความเข้มข้นของสารดีเนทูแรนท์เพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกับอเล็กโตรโฟรีซิส โดยพบว่าเมื่อดีเอ็นเอเคลื่อนที่มาถึงบริเวณที่มีความเข้มข้นของสารดีเนทูแรนท์ที่เท่ากับ T_m ดีเอ็นเอจะเริ่มคลายเกลียวแยกเป็นสายเดี่ยวทีละส่วนเกิดเป็น โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) จึงทำให้มีการเคลื่อนที่ในเจลอะครีลาไมด์ได้ช้าลง โดยขึ้นดีเอ็นเอที่มีปริมาณ GC สูงจะเกิดการคลายเกลียวได้ในบริเวณที่มีสารดีเนทูแรนท์ความเข้มข้นสูง ทำให้มีระยะทางในการเคลื่อนที่บนเจลมากกว่าขึ้นดีเอ็นเอที่มีปริมาณ GC ที่ต่ำกว่า ซึ่งจากระยะทางที่แตกต่างกันในการเคลื่อนที่บนเจลจึงสามารถนำเทคนิคนี้มาใช้ในการตรวจสอบกลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างต่าง ๆ ได้ (Tannock, 2002; Sigler *et al.*, 2004)

ตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ด้วย DGGE จะต้องนำมาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีส่วนของ GC clamp อยู่ด้วย เพื่อหลีกเลี่ยงการแยกเป็นสายเดี่ยวที่สมบูรณ์ของขึ้นดีเอ็นเอ ซึ่งจะทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของขึ้นดีเอ็นเอได้ ดังนั้นในการทำ PCR สำหรับการวิเคราะห์ DGGE จึงมีการออกแบบให้ไพรเมอร์ที่ใช้มีส่วนของ GC clamp ที่ปลายไพรเมอร์ชนิด forward เพื่อให้มี GC clamp ที่ส่วนปลาย 5' ของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ โดย GC clamp จะทำหน้าที่ในการยึดปลายของดีเอ็นเอและทำให้เกิดเป็น โครงสร้างทุติยภูมิได้เมื่อวิเคราะห์ด้วย DGGE (Don *et al.*, 1991; Muyzer *et al.*, 1993; Janse *et al.*, 2004;)

การใช้เทคนิค DGGE สามารถใช้เพื่อตรวจติดตามจุลินทรีย์ได้ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ รา รวมทั้งไซยาโนแบคทีเรีย ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย (McBain *et al.*, 2003; Lee *et al.* 2004; McGarvey *et al.*, 2004; Burr *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2007) จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารหมักและไวน์ (Ampe *et al.*, 1999; Lopez *et al.*, 2003) จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก (Waters *et al.*, 2006) และจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (Tannock *et al.*, 1999; 2000; Green *et al.*, 2006) ระบบทางเดินอาหารของปลวก (Wagner *et al.*, 2003) ระบบทางเดินอาหารของไก่ (Apajalahti *et al.*, 1998) จุลินทรีย์ในไส้ดินของไก่ (Gong *et al.*, 2002) การติดตามผลของอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของไก่ (Netherwood *et al.*, 1999) รวมทั้งการหาการกลายพันธุ์ของยีนในทางการแพทย์ได้ (Fodde and Losekoot, 1994)

Wielen *et al.* (2002) ศึกษาของกลุ่มของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของไก่โดยใช้ไพรเมอร์ U968-GC และ L1401 เพื่อสังเคราะห์ 16s rDNA ส่วน V6-V8 ของจุลินทรีย์ในตัวอย่างจากระบบทางเดินอาหารของไก่ และทำการวิเคราะห์ด้วย DGGE พบว่าในไก่ที่มีอายุมากขึ้นจะพบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจล DGGE ได้เพิ่มขึ้น แสดงถึงการมีความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่เพิ่มมากขึ้นในระบบทางเดินอาหารของไก่ และจากการศึกษาของ Knarreborg *et al.* (2002) ที่ใช้เทคนิค PCR-DGGE เพื่อติดตามผลของแหล่งไขมันและสารปฏิชีวนะต่อจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กส่วนไอเรียมของไก่ในช่วงอายุต่าง ๆ โดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ HDA1-GC และ HDA2 สำหรับจุลินทรีย์ทั่วไป Lac1 และ Lac2-GC สำหรับ *Lactobacilli* และ Cpa1-GC และ Cpa2 สำหรับ *Clostridium perfringens* พบว่าสารปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิด คือ avilamycin และ salinomycin มีผลทำให้มีปริมาณของ *Lactobacillus* เพิ่มขึ้นในไก่อายุ 14 และ 21 วัน และพบว่าทั้งสารปฏิชีวนะและน้ำมันถั่วเหลือง มีผลทำให้ปริมาณของ *Clostridium perfringens* ลดลงได้ Tannock *et al.* (2000) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์เมื่อบริโภคผลิตภัณฑ์นมเสริม *Lactobacillus rhamnosus* DR20 โดยใช้ไพรเมอร์ HDA1-GC และ HDA2 ที่มีความจำเพาะกับตำแหน่ง V2-V3 ของ 16S rDNA ของจุลินทรีย์

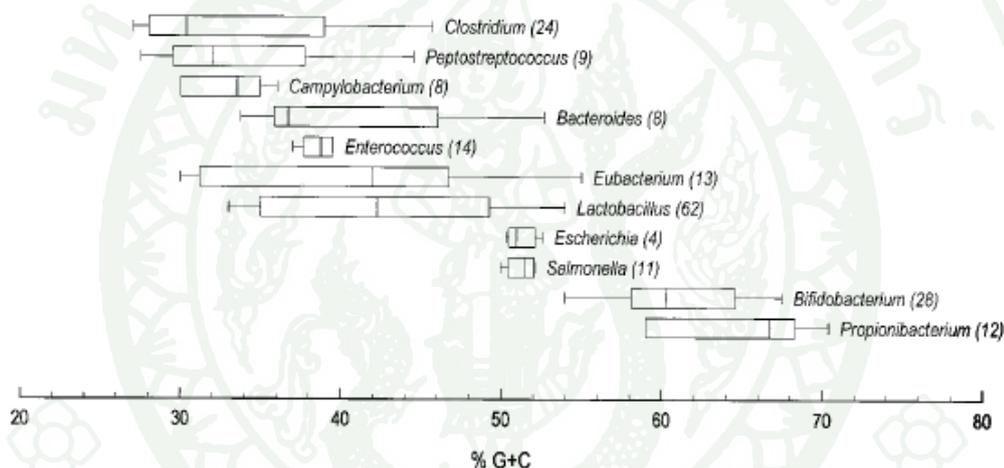
การวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ในตัวอย่างด้วยเทคนิค PCR-DGGE ที่ทำโดยอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสใน 16S rRNA (rDNA) พบว่าการเลือกใช้ไพรเมอร์จะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ต้องการติดตาม เนื่องจากไพรเมอร์แต่ละชนิดมีความจำเพาะกับตำแหน่งของ 16S rDNA ที่ต่างกัน ในจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE

primer	target taxon	region	reference
U968-GC and L1401	universal	V6-V8	Wielen <i>et al.</i> (2002)
HDA1-GC and HDA2	universal	V2-V3	Tannock <i>et al.</i> (2000)
GC-338 and 518	universal	V3	Ampe <i>et al.</i> (1999)
Lac1 and Lac2-GC	lactic acid bacteria	-	Knarreborg <i>et al.</i> (2002)
Cpa1-Gc and Cpa2	<i>C. perfringens</i>	alpha toxin gene	Knarreborg <i>et al.</i> (2002)
341-GC and 907	universal	-	Bowman <i>et al.</i> (2003)

4. จุลินทรีย์ที่พบในระบบทางเดินอาหารของไก่

ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์แรกเกิดไม่พบจุลินทรีย์ แต่จะได้รับจุลินทรีย์จากสิ่งแวดล้อม และจากแม่ทันทีที่ฟักออกจากไข่ หลังจากนั้นแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารจะมีการเปลี่ยนแปลงตามชนิดและปริมาณของอาหารที่กิน ในระบบทางเดินอาหารพบจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลาย 400-500 ชนิด โดยพบตั้งแต่ในปากจนถึงลำไส้ใหญ่ Apajalahti *et al.* (1998) ทำการศึกษาและจัดแบ่งจุลินทรีย์ที่พบได้ในระบบทางเดินอาหารของไก่ตามปริมาณของ GC ได้ดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 จุลินทรีย์ที่พบในระบบทางเดินอาหารของไก่

ที่มา: Apajalahti *et al.* (1998)

4.1 ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของไก่

ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ที่พบในระบบทางเดินอาหารของไก่ในแต่ละส่วนมีความแตกต่างกัน (Apajalahti *et al.*, 1998) จากการศึกษาของ Lu *et al.* (2003) พบว่าจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กส่วนไอเลียมและไส้ตัน มีความแตกต่างกันทั้งชนิดของจุลินทรีย์และปริมาณจุลินทรีย์ที่พบดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในไอเลียมและไส้ตันของไก่

group (% total)	genus	% of genus in	
		ileum	cecum
low G+C, gram positive	<i>Lactobacillus</i>	67.59	7.75
	<i>Weisella</i>	1.05	0.48
	<i>Clostridium</i>	9.69	39.26
	<i>Ruminococcus</i>	0.44	16.48
	<i>Eubacterium</i>	0.73	9.85
	<i>Bacillus</i>	0.67	1.45
	<i>Staphylococcus</i>	0.95	0
	<i>Streptococcus</i>	6.63	0.65
	<i>Enterococcus</i>	6.43	0.97
high G+C, gram positive	<i>Fusobacterium</i>	0.73	13.89
	<i>Bifidobacterium</i>	0.19	0
Proteobacteria , gram negative	<i>Ochrobacterium</i>	0.18	0.81
	<i>Alcaligenes</i>	0.88	0.65
	<i>Escherichia</i>	0.35	1.29
	<i>Campylobacter</i>	0.88	0
Cytophaga/Flexibacter/Bacteroides	<i>Flavobacterium</i>	0	0.16
	<i>Bacteroides</i>	0.60	5.01

ที่มา: Lu *et al.* (2003)

ในกระเพาะพักพบการยึดเกาะของ *Lactobacillus* ที่อพิทีเลียนเซลล์ โดยพบได้ตั้งแต่วันแรกภายหลังจากการฟักตัวของไก่ ปริมาณที่พบในส่วนของผนังจะใกล้เคียงกับในส่วนของ ลูเมน ปริมาณที่พบจะขึ้นอยู่กับปริมาณอาหารที่เข้าสู่กระเพาะพัก การยึดเกาะของ *Lactobacillus* บางชนิดเกิดจากการสร้างเมือกที่เป็น carbohydrate-rich capsular layer เช่น *Lactobacillus salivarius* ทำให้มีความสามารถในการยึดเกาะกับผิวหนังของกระเพาะพักได้ดีจึงพบ

กระเพาะแพะและกระเพาะบด มีค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 1-2 จึงพบได้เฉพาะ จุลินทรีย์ที่ทนต่อกรดได้เป็นส่วนใหญ่เท่านั้น เช่น *Lactobacillus* สำหรับ *Escherichia coli* *Streptococcus* และ ยีสต์พบได้ในปริมาณน้อย (Gabriel *et al.*, 2006)

ลำไส้เล็กแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ดูโอดินัม เจจูนัม และไอเรียม พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่มีการเพิ่มจำนวนได้น้อยในส่วนดูโอดินัม เนื่องจากมีการเคลื่อนที่ของอาหารหรือของเหลวออกจากส่วนนี้อย่างรวดเร็วและมีสภาพที่ไม่เหมาะสม โดยพบว่ามีความเข้มข้นของเอนไซม์และ น้ำดีที่สูง ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Gabriel *et al.*, 2006) สำหรับลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมและไอเรียมมีปริมาณจุลินทรีย์ 10^7 - 10^9 CFU โดยกลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบในไอเรียมจะ คล้ายคลึงกับที่จุลินทรีย์ที่พบในส่วนของเจจูนัม จุลินทรีย์ที่พบได้แก่กลุ่ม *Lactobacilli* *Enterococci* *Streptococci* *Staphylococci* และ *coliform* (Knarreborg *et al.*, 2002; Bjerrum *et al.*, 2006) Amit-Romach *et al.* (2004) ศึกษาจุลินทรีย์ในลำไส้ทั้ง 3 ส่วน พบว่าจุลินทรีย์ในลำไส้แต่ละส่วนมีความคล้ายคลึงกันในช่วงแรกเกิดถึง 4 วัน หลังจากนั้นจะมีปริมาณของจุลินทรีย์ที่พบแตกต่างกัน โดยที่อายุ 25 วัน ลำไส้ส่วนดูโอดินัมพบ *Lactobacillus* *coliform* และ *Clostridium* มีปริมาณมากกว่าที่พบในส่วนเจจูนัมและไอเรียม Dumonceaux *et al.* (2006) พบว่าส่วนของลำไส้ทั้งดูโอดินัมและไอเรียม พบจุลินทรีย์กลุ่ม *Actinobacteria* *Bacillales* *Clostridiales* และ *Lactobacillales* สำหรับในส่วนเจจูนัมพบ *Actinobacteria* *Bacillales* และ *Lactobacillales* แต่ไม่พบการเจริญของ *Clostridiales* และจากการศึกษาของ Lu *et al.* (2003) จุลินทรีย์ที่พบในไอเรียม ได้แก่ *Lactobacillus* *Weissella* *Clostridium* *Ruminococcus* *Eubacterium* *Bacillus* *Staphylococcus* *Streptococcus* *Enterococcus* *Fusobacterium* *Bifidobacterium* *Ochrobacterium* *Alcaligenes* *Escherichia* *Campylobacter* และ *Bacteroides*

ไส้ตัน ในระบบทางเดินอาหารพบว่าไส้ตันเป็นส่วนที่มีปริมาณจุลินทรีย์สูงสุด คือ 10^{11} CFU มีความหลากหลายของกลุ่มจุลินทรีย์สูงสุด (complex flora) โดยพบจุลินทรีย์มากกว่า 38 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่เจริญได้ในสภาวะไร้อากาศ (obligate anaerobe) แกรมลบ รูปกลม ได้แก่ *Peptostreptococcus* sp. *Bacteroides* sp. *Eubacterium* sp. *Bifidobacterium* sp. และ

4.2 บทบาทของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของไก่

จุลินทรีย์ที่พบในระบบทางเดินอาหารของไก่พบได้ทั้งจุลินทรีย์กลุ่มที่มีประโยชน์ และกลุ่มที่ก่อโรค ซึ่งจุลินทรีย์ที่พบมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพ การเจริญเติบโต การเกิดโรคและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไก่ ดังนี้

4.2.1 ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีประโยชน์ต่อไก่ ในกระเพาะปักษีมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดอินทรีย์ วิตามิน B K และ E ในไส้ตันมีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายยูเรียได้เป็นแอมโมเนีย ซึ่งเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อไก่ (Gabriel *et al.*, 2006)

4.2.2 มีอิทธิพลต่อสุขภาพและการเจริญเติบโตของไก่ พบว่าเมื่อมีปริมาณของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารปริมาณมากจะทำให้เกิดการแย่งสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของไก่ทำให้ไก่มีอาการเจริญเติบโตที่ลดลง (Gabriel *et al.*, 2006) สำหรับในอาหารที่ให้จุลินทรีย์โปรไบโอติกพบว่ามีการส่งเสริมการเจริญเติบโตของไก่ให้ดีขึ้น ลดการเป็นโรคและการตายได้ Ashiraf *et al.* (2005) พบว่าในไก่ที่ให้โปรไบโอติก *Lactobacillus acidophilus* *Aspergillus oryzae* และ *Streptococcus thermophilus* มีการกินอาหารและน้ำ มีน้ำหนักตัว และแอนติบอดีสูงกว่ากลุ่มควบคุม และไม่พบการตายของไก่เมื่อให้ *Salmonella gallinarum* แสดงว่าโปรไบโอติกสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและป้องกันการติดเชื้อก่อโรคได้ Timmerman *et al.* (2006) พบว่าไก่ที่ให้โปรไบโอติก CSPB ซึ่งประกอบด้วย *Lactobacillus bifementans* W204.5 *Lactobacillus sanfranciscensis* W205.6 *Lactobacillus sanfranciscensis* W208.6 *Lactobacillus reuteri* W218.2 *Lactobacillus reuteri* W223.5 *Lactobacillus reuteri* W227.3 และ *Lactobacillus fermentum* W227.5 มีน้ำหนักตัวต่อวันและประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ดีขึ้น Yoruk *et al.* (2004) พบว่าการเลี้ยงไก่ไข่โดยให้โปรไบโอติกซึ่งประกอบด้วย *Lactobacillus* *Bifidobacterium* *Streptococcus* และ *Enterococcus* พบว่าสามารถส่งเสริมผลผลิตไข่และคุณภาพของไข่ได้ดีขึ้น

4.2.3 การเกิดโรคในไก่ พบว่าเมื่อมีการเจริญของเชื้อก่อโรคในไก่ได้มากกว่ากลุ่มอื่น จะมีผลทำให้เกิดภาวะของโรคเกิดขึ้น และมีผลกระทบต่อสุขภาพของไก่ แต่ถ้าในระบบทางเดินอาหารมีการเจริญของเชื้อที่มีประโยชน์ในปริมาณมาก เช่น *Lactobacillus* ผลิตรกรดแลคติกทำให้ค่าความเป็นกรดต่างลดลงซึ่งเป็นสภาวะที่ *Escherichia coli* *Salmonella* *Campylobacter* และ *Clostridium* เจริญไม่ได้ นอกจากนี้ยังพบว่ากรดแลคติกและกรดอะซิติกที่ผลิตจาก *Lactobacillus* มีผลยับยั้งการเจริญของ *Salmonella typhimurium* โดยมีผลกระทบต่อโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์และ oxidative metabolism ของเซลล์ และ *Lactobacillus* บางชนิดสามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ผลิตสารปฏิชีวนะ ผลิต bacteriocin-like substance ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ สำหรับการศึกษเกี่ยวกับกรยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารจัดเป็นกลไกที่มีความซับซ้อนมาก (highly complex) จึงคาดว่าน่าจะเกิดจากหลายปัจจัยร่วมกัน (Fuller, 1992)

4.2.4 การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาภายในลำไส้ไก่ พบว่า *Bacillus subtilis* (Yamauch, 2002) *Bacillus subtilis* var. *natto* (Samanya and Yamauchi, 2002) *Lactobacillus reuteri* (Edens et al., 1997) และ Bacterial pool ซึ่งประกอบด้วย *Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus casei* *Streptococcus lactis* *Streptococcus faecium* *Bifidobacterium bifidum* และ *Aspergillus oryzae* (Pelicano et al., 2007) มีบทบาททำให้วิลไล (villi) มีความยาว มีพื้นที่ผิวในการดูดซึมสารอาหาร และมีการแบ่งเซลล์ได้เพิ่มมากขึ้น โดยพบการส่งเสริมการพัฒนาของวิลไลได้ดีในลำไส้ส่วนคูโอดินัมและเจจูนัม จากการที่วิลไลในลำไส้เล็กมีการพัฒนาได้ดีขึ้นจึงทำให้ไก่ได้รับสารอาหารได้มากยิ่งขึ้นและมีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น (Samanya and Yamauchi, 2002)

4.2.5 ระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าเมื่อระบบทางเดินอาหารมีการเจริญของเชื้อก่อโรคกลุ่ม Enterobacteriaceae เช่น *Escherichia coli* เพิ่มมากขึ้น จะมีผลกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immune response) ของไก่ให้เพิ่มขึ้นได้ (Fuller, 1992) Karbi et al. (2004) พบว่าการให้โปรไบโอติก Protexin Boost ซึ่งประกอบด้วย *Lactobacillus plantarum* *Lactobacillus bulgaricus* *Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus rhamnosus* *Bifidobacterium bifidum* *Streptococcus thermophilus* *Enterococcus faecium* *Aspergillus oryzae* และ *Candida pintolopessi* มีผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันในไก่ได้เพิ่มขึ้น

4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของไก่

4.3.1 อายุของไก่ ลูกไก่ภายหลังจากการฟักตัวพบจุลินทรีย์ปริมาณน้อย แต่หลังจากได้กินอาหารจะพบการเพิ่มจำนวนของ facultative anaerobe โดยเฉพาะกลุ่ม coliform และ *Streptococci* และอาจพบ *Clostridia* ได้บ้าง และเมื่อไก่มีอายุเพิ่มมากขึ้นพบว่าปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ที่พบจะเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ (Wielen *et al.*, 2002) โดยในกระเพาะพักและในลำไส้เล็กจะมีกลุ่มของ *Lactobacillus* เจริญเพิ่มจำนวนได้ดี และในไส้ตันจะมีการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มจุลินทรีย์อยู่ตลอดเวลาในช่วงอายุ 4-6 สัปดาห์ และหลังจากนั้นจึงจะมีการคงตัวของกลุ่มจุลินทรีย์เกิดขึ้น (Amit-Romach *et al.*, 2004)

4.3.2 อาหาร การเปลี่ยนอาหารสำหรับการเลี้ยงไก่มีผลต่อกลุ่มของจุลินทรีย์โดยพบว่าเมื่อมีสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตสูงจะพบว่าปริมาณของ *Lactobacillus* เพิ่มมากขึ้น แต่ถ้ามีสารอาหารประเภทโปรตีนสูงจะมีผลทำให้มีปริมาณลดลง (Gabriel *et al.*, 2006) และพบกลุ่มของ Coliform *Clostridia* และ *Streptococci* เพิ่มมากขึ้น และเมื่อใช้อาหารที่ไม่เติมวิตามินจะพบกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตวิตามินได้เพิ่มขึ้น (vitamin-producing bacteria) จากการศึกษาของ Knarreborg *et al.* (2002) พบว่าปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในไออเรียมและไส้ตันในไก่ที่ให้แหล่งไขมันและให้สารปฏิชีวนะ มีปริมาณและกลุ่มของจุลินทรีย์ *Streptococci* *Enterobacter* *Clostridium perfringens* และ *Lactobacillus* ที่ตรวจพบในปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงถึงอิทธิพลของอาหารที่มีต่อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร

4.3.3 สารปฏิชีวนะ (antibiotic) การใช้สารปฏิชีวนะในไก่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก (Knarreborg *et al.*, 2002) กลุ่มที่มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ (antibiotic resistant) หรือกลุ่มที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีพลาสมิดที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ (antibiotic resistant plasmid) พบว่า tetracycline มีผลทำให้ *Clostridium perfringens* และ *Enterococcus hirae* มีปริมาณลดลง แต่เนื่องจาก tetracycline เป็นสารปฏิชีวนะที่ออกฤทธิ์กว้างจึงทำให้มีผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นประโยชน์ได้ (growth-depressing strains) ทำให้มีการเจริญได้ลดลง และการใช้สารปฏิชีวนะในปริมาณมากเกินไป เช่น การใช้ benzyl penicillin และ tetracycline ทำให้เกิดการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะในกลุ่ม enteropathogens และ *Escherichia coli* ได้ และ McDermott *et al.* (2005) พบการดื้อยา verginiamycin ของ *Enterococcus faecium* ในไก่ ดังนั้น

4.3.4 โพรไบโอติก ชนิดและปริมาณของโพรไบโอติกส์มีผลต่อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร โดยการใช้อาหารที่ผสม *Enterococcus faecalis* จะทำให้มีปริมาณจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารเพิ่มขึ้น (Netherwood *et al.*, 1999) และในอาหารที่ผสม *Lactobacillus salivarius* CTC2197 10^5 CFU ต่อกรัม โดยให้ในวันแรกของการเลี้ยงไก่ พบว่าสามารถป้องกันการเจริญของ *Salmonella enteritidis* ได้ (Pascual *et al.*, 1999) Barbosa *et al.* (2005) พบว่า *Bacillus subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* O78:K80 *Salmonella* Enteritidis และ *Clostridium perfringens* ในลำไส้ของไก่ได้ Mountzouris *et al.* (2007) พบว่าไก่ที่ได้รับโพรไบโอติกที่ประกอบด้วย *Lactobacillus reuteri* *Lactobacillus salivarius* *Enterococcus faecium* *Bifidobacterium animalis* และ *Pediococcus acidilactici* มีกลุ่มจุลินทรีย์ที่พบในไส้ตันแตกต่างไปจากไก่ที่ให้อาหารสูตรควบคุม โดยพบว่าไก่อกลุ่มที่ให้โพรไบโอติกมี *Lactobacillus* spp. *Bifidobacterium* spp. และจุลินทรีย์แกรมบวก รูปกลม มากกว่าที่พบกลุ่มควบคุม Murry *et al.* (2006) พบว่าในไส้ตันของไก่ที่ได้รับโพรไบโอติก *Lactobacilli* 0.1% มีปริมาณของ *Lactobacilli* เพิ่มขึ้น และมีปริมาณ *Clostridium perfringens* ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับไก่ในกลุ่มควบคุม

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

Lactobacillus reuteri KUB-AC5 ที่คัดแยกได้จากลำไส้ไก่ (Nitisinprasert *et al.* , 2000) ใช้เป็นแหล่งของจุลินทรีย์โปรไบโอติกสำหรับเลี้ยงไก่

1.2 เชื้อก่อโรค

Salmonella Enteritidis S003 ที่คัดแยกได้จากลำไส้ไก่ (Nitisinprasert *et al.* , 2000) ใช้เป็นเชื้อที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคในไก่

1.3 เชื้อที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

Lactobacillus acidophilus , *Lactobacillus salivarius* KUB-AC21, *Escherichia coli* E010 และ *Salmonella* Enteritidis S003 ที่คัดแยกได้จากลำไส้ไก่ (Nitisinprasert *et al.* , 2000)

2. สัตว์ทดลอง

ไก่กระทงคณะแพศ โดยการศึกษาผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 และยาปฏิชีวนะต่อไก่เนื้อ ใช้ไก่พันธุ์ Arbor Acres อายุ 1 วัน จำนวน 90 ตัว และการศึกษาผลของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ภายใต้อาการปนเปื้อน *Salmonella* Enteritidis S003 ต่อไก่เนื้อ ใช้ไก่พันธุ์ Ross อายุ 1 วัน จำนวน 210 ตัว

3. อาหารทดลอง

อาหารผง มีส่วนประกอบอาหารแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 วัตถุประสงค์และส่วนประกอบโภชนะของอาหารทดลองน้ำหนักรวม 100 กิโลกรัม

วัตถุประสงค์ (กิโลกรัม)	ระยะที่ 1 (1-21 วัน)	ระยะที่ 2 (22-42 วัน)	ระยะที่ 3 (43-49 วัน)
ข้าวโพด	55.37	60.47	65.54
น้ำมันรำข้าว	4.00	4.00	4.00
กากถั่วเหลือง	31.55	27.24	22.87
ปลาป่น	6.29	5.48	4.70
ดีแอล-เมทไธโอนีน	0.21	0.19	0.20
โมนโนไคแคลเซียมฟอสเฟต	0.93	0.91	0.94
หินฟูน	0.61	0.65	0.67
เกลือ	0.30	0.31	0.33
วิตามินพริมีกซ์ ¹	0.50	0.50	0.50
ยาพริมีกซ์ ²	0.25	0.25	0.25
รวม	100	100	100
ส่วนประกอบโภชนะจากการวิเคราะห์			
โปรตีนรวม (%)	22	20	18
พลังงานรวม (กิโลแคลอรี/ กก.)	3,100	3,150	3,200
แคลเซียม (%)	0.90	0.85	0.80
ฟอสฟอรัส (%)	0.45	0.42	0.40
เมทไธโอนีน (%)	0.59	0.55	0.52
เมทไธโอนีนและซิสทีน (%)	0.92	0.85	0.80

¹ ส่วนประกอบต่อ 100 กิโลกรัมอาหาร : vitamin A 450,000 IU (retinyl acetate), cholecalciferol 100,000 IU, vitamin E 2,500 IU (dl- α -tocopheryl acetate), vitamin B₁₂ 2 mg, menadione 150 mg, riboflavin 300 mg, thiamine 150 mg, pantothenic acid 500 mg, niacin 2,000 mg, choline 15,000 mg, folic acid 50 mg, biotin 50 mg และ pyridoxine 250 mg

² Minosin

วิธีการ

1. การศึกษาผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 และยาปฏิชีวนะต่อไก่เนื้อ

1.1 การเตรียมเซลล์ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

นำเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ผสมกลีเซอรอลให้ได้เข้มข้นสุดท้าย 15 % ในสารละลายเซลล์ และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำมาเตรียมเซลล์โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS ที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) 0.6% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และถ่ายเชื้อจำนวน 1 หลอด ลงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อในปริมาตร 5% ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และถ่ายเชื้อในปริมาตร 5% ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ในระดับที่มีการขยายขนาดเพิ่มขึ้นจากเดิม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์

1.2 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์โดยการห่อหุ้มเซลล์ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ด้วยอัลจิเนต

การห่อหุ้มเซลล์ตามวิธีการของ Sultana *et al.* (2000) นำน้ำหมักที่เตรียมโดยวิธีการที่ 1.1 มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำเซลล์ที่ได้ผสมในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และผสมกับสารละลายอัลจิเนต 2% 40 มิลลิลิตร ปั่นผสมด้วยเครื่องผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน และเติมน้ำมันปาล์มที่มี tween 80 0.2% ลงไป และปั่นด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งส่วนผสมเกิดลักษณะการเป็นอิมัลชัน เติมน้ำสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร โดยค่อยๆ เติมให้ไหลลงทางด้านข้างของภาชนะด้วยปิเปต และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เม็ดบีดแข็งตัว และตกตะกอนแยกชั้นลงมาอยู่ในส่วนของสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จากนั้นแยกเม็ดบีดออกจากสารละลายและเก็บในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ที่ผสมกลีเซอรอล 5% ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเม็ดบีดเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ในเม็ดบีด

1.3 การเลี้ยงไก่ด้วยอาหารผสมเชื้อโปรไบโอติก และอาหารผสมยาปฏิชีวนะ

นำลูกไก่พันธุ์ Arbor Acres อายุ 1 วัน จำนวน 90 ตัว มาจัดเข้าคอกแบบกรงแพลตตินัม โดยวิธีการสุ่มหยิบ กลุ่มละ 30 ตัว จำนวน 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เลี้ยงด้วยอาหารผงทดลองสูตรควบคุม (control) กลุ่มที่ 2 อาหารผงผสม avilamycin 0.005 มิลลิกรัมต่อกรัมอาหาร (avilamycin) กลุ่มที่ 3 อาหารผสมเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจินตที่มีปริมาณของเชื้อ 10^7 CFU ต่อกรัมอาหาร (LAB-10⁷) โดยให้ในช่วงอายุ 1-42 วัน และให้อาหารสูตรควบคุมในช่วงอายุ 43-49 วัน ในระหว่างการเลี้ยงบันทึกข้อมูล ได้แก่ น้ำหนักไก่ และปริมาณอาหาร เพื่อคำนวณหา น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ปริมาณอาหารที่กิน ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหาร รวมทั้งบันทึกอัตราการตาย และเก็บตัวอย่างที่อายุไก่ 1 3 7 21 42 และ 49 วัน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างใส่ใส่ไก่ส่วนเจจุน้ำ จากไก่จำนวน 4 ตัว ต่อกลุ่ม เป็นเพศเมีย 2 ตัวและเพศผู้ 2 ตัว เพื่อนำไปวิเคราะห์ความสูงของวิลลัส ปริมาณของจุลินทรีย์ และความหลากหลายของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE

2. การศึกษาผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ต่อไก่เนื้อ ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella Enteritidis* S003 2 แบบ

2.1 การทำแห้งแบบพ่นฝอยเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5

การทำแห้งแบบพ่นฝอยคัดแปลงจากวิธีการของ Hamsupo (2005) นำน้ำหมักที่เตรียมโดยวิธีการที่ 1.1 มาผสมกับสารตัวพา คือ นมผงขาดมันเนย Dumex 15% และนำส่วนผสมที่ได้มาทำให้แห้ง โดยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยระดับโรงงานนำทาง (pilot scale) (SEIKO, Japan) โดยสภาวะของการป้อนเข้าที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส การนำออกที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และความเร็วของหัวพ่น 40,000 เฮิร์ตซ์ เก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ผงเพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์และความชื้น

2.2 การเลี้ยงไก่ด้วยอาหารผสมเชื้อโปรไบโอติกภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella Enteritidis* S003

นำลูกไก่พันธุ์ Ross อายุ 1 วัน จำนวน 210 ตัว มาจัดเข้าคอกแบบเลี้ยงพื้น โดยวิธีการสุ่มหยิบ กลุ่มละ 30 ตัว จำนวน 7 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เลี้ยงด้วยอาหารผงทดลองสูตรควบคุม (CON-SIM) กลุ่มที่ 2-4 เลี้ยงด้วยอาหารผสมเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกแบบผงแห้ง

แบบพ่นฝอยที่ปริมาณของเชื้อ 10^5 (LAB- 10^5 -SIM) 10^6 (LAB- 10^6 -SIM) และ 10^7 (LAB- 10^7 -SIM) CFU ต่อกรัมอาหาร และให้เชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 ปริมาณ 10^6 CFU ต่อตัว ในไก่อายุ 1 วัน จัดเป็นชุดการทดลองแบบ SIM ซึ่งเป็นสภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 พร้อมกับการให้เชื้อ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 และกลุ่มที่ 5-7 เลี้ยงด้วยอาหารผสมเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกแบบผงแห้งแบบพ่นฝอยที่ปริมาณของเชื้อ 10^5 (LAB- 10^5 -SEP) 10^6 (LAB- 10^6 -SEP) และ 10^7 (LAB- 10^7 -SEP) CFU ต่อกรัมอาหาร และให้เชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 ปริมาณ 10^6 CFU ต่อตัว ในไก่อายุ 3 วัน จัดเป็นชุดการทดลอง SEP ซึ่งเป็นสภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 ภายหลังการให้เชื้อ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 2 วัน การให้อาหารผงผสมโปรไบโอติกจะให้ในไก่อายุ 1-20 วัน และหลังจากนั้นให้อาหารสูตรควบคุมทั้งหมด ในระหว่างการเลี้ยงบันทึกข้อมูล ได้แก่ น้ำหนักไก่ และปริมาณอาหาร เพื่อคำนวณหาปริมาณที่เพิ่มขึ้น ปริมาณอาหารที่กิน ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหาร รวมทั้งบันทึกอัตราการตาย และเก็บตัวอย่างไก่อายุ 1 7 14 21 และ 28 วัน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างลำไส้ไก่ส่วนเจจูนัม จากไก่จำนวน 4 ตัว ต่อกลุ่ม เป็นเพศเมีย 2 ตัว และเพศผู้ 2 ตัว เพื่อนำไปวิเคราะห์ความสูงของวิลลัส ปริมาณของจุลินทรีย์ และความหลากหลายของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE

3. การวิเคราะห์ความสูงของวิลลัส

3.1 การเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อ

การเตรียมสไลด์ตามวิธีของ สุกัลักษณ์ (2545) นำตัวอย่างลำไส้ส่วนเจจูนัมมาตัดให้ความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร นำมาผ่าและตรึงบนโคม โดยตรึงเนื้อเยื่อด้วยเข็มหมุดทั้ง 4 มุม และแช่ในเนทิวรัลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน (natural buffer formalin) 24 ชั่วโมง เพื่อรักษา (fixing) เซลล์ และเนื้อเยื่อให้อยู่ในสภาพที่ใกล้เคียงกับเมื่อมีชีวิต จากนั้นตัดแต่ง (trim) เนื้อเยื่อเป็นชิ้นมีความหนาไม่เกิน 4 มิลลิเมตร ห่อด้วยผ้าขาวบางและใส่ในกลักและแช่ในเนทิวรัลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน 24 ชั่วโมง ล้าง (washing) โดยนำกลักใส่ภาชนะนำไปรองไว้ใต้ก๊อกน้ำ และเปิดให้น้ำไหลผ่านตลอดเวลา 30 นาที นำเนื้อเยื่อเข้าเครื่องทิกซุโพรเซสเซอร์อัตโนมัติ (automatic tissue processor) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์ ขั้นตอนการเคลียร์ (clearing) โดยไซลีน เพื่อแทนที่แอลกอฮอล์และเป็นตัวนำพาราฟินเข้าสู่เนื้อเยื่อ ขั้นตอนการแทรกซึมของพาราฟิน (infiltration) เพื่อทำให้พาราฟินเหลวที่มีอุณหภูมิ

สูงกว่าจุดหลอมเหลวไม่เกิน 5 องศาเซลเซียส สามารถแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อได้อย่างสม่ำเสมอทั้งเนื้อเยื่อ

นำมาทำการตัดแต่ง (trimming) หน้าบล็อก โดยใช้มีดผ่าตัดพาราฟินที่ผิวหน้าออกจนเริ่มถึงเนื้อเยื่อ เพื่อให้ผิวหน้าเสมอกัน และตัดด้านข้างทั้ง 4 ด้านให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู และตัดเซกชัน (sectioning) หน้าบล็อกไปแช่เย็นโดยวางผิวหน้าของบล็อกให้สัมผัสกับพื้นที่เย็น และนำมาตัดด้วยเครื่องไมโครทอม เพื่อให้ได้ความหนา 4-5 ไมครอน โดยเซกชันที่ตัดได้จะเป็นแถบยาว (ribbon) และติดเซกชันบนสไลด์ (affix) นำแถบเซกชันมาตัดเป็นชิ้นโดยวางบนสไลด์ที่หยดแอลกอฮอล์ 50% โดยวางให้ด้านที่สัมผัสมีอยู่ด้านล่างซึ่งสัมผัสกับสไลด์ และนำไปลอยในน้ำที่ผสมเจลาติน 0.5% อุณหภูมิ 43-45 องศาเซลเซียส และนำสไลด์มาซ้อนเซกชันที่ลอยไว้ และนำมาทำให้แห้งโดยวางบนสไลด์วอมเมอร์ อุณหภูมิ 43-45 องศาเซลเซียส และย้อมสี (staining) สีมาท็อกไซลินและอีโอซิน

3.2 การวัดความสูงของวิลลัส

ตรวจวัดความสูงของวิลลัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) โดยวัด 5 ตำแหน่งต่อสไลด์ด้วยไมโครมิเตอร์ (micrometer) และหาค่าเฉลี่ยความสูงของวิลลัส (Sun *et al.*, 2005)

4. การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์

การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ตามวิธีการของ Salanitro *et al.* (1974) ทำโดยตัดตัวอย่างลำไส้บริเวณช่วงกลางของชิ้นตัวอย่างปริมาณ 1 กรัม ใต้ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% 9 มิลลิลิตร และนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องสโตมาสเตอร์ จากนั้นทำการเจือจางต่อจนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม นำไปสเปรดบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.6% และอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI บ่มในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญ

5. การวิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE

การวิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์ในไก่แต่ละกลุ่ม ทำโดยสุ่มเก็บตัวอย่างลำไส้ไก่ส่วนเจนนัม กลุ่มละ 4 ตัว เป็นตัวผู้ 2 ตัว และตัวเมีย 2 ตัว นำมาวิเคราะห์ความหลากหลายของจุลินทรีย์ด้วยวิธี PCR-DGGE โดยเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบภายในลำไส้ การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเพื่อเพิ่มปริมาณตัวอย่างดีเอ็นเอ การวิเคราะห์ความหลากหลายด้วยวิธี PCR-DGGE และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่พบบนเจล DGGE ซึ่งจากผลการทดลองจะคำนวณผลเป็นร้อยละ (%) ของการพบเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดในไก่ โดยถ้าพบเชื้อในไก่จำนวน 1 2 3 และ 4 ตัว คิดเป็นร้อยละของการพบ 25% 50% 75% และ 100% ตามลำดับ

5.1 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงจากวิธีการของ Knarreborg *et al.*(2002); Randazzo *et al.*, (2002); Zhu *et al.*(2002) ทำโดยนำตัวอย่างลำไส้ 0.5 กรัม นำมาผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % 9.5 มิลลิลิตร และนำเข้าเครื่องสโตมาสเซอร์ เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 800 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเก็บส่วนใสปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเก็บตะกอนที่ได้มาละลายใน TE 1,000 ไมโครลิตร และถ่ายใส่ในหลอดที่มีเม็ดบีท zirconia 0.3 กรัม นำหลอดตัวอย่างเข้าเครื่อง mini bead beater (Biospec product) ความเร็วในการเขย่า 4,800 รอบต่อนาที นาน 180 วินาที โดยแบ่งการเขย่าเป็น 50 50 และ 80 วินาที ในแต่ละรอบของการเขย่าจะสลับกับการแช่น้ำแข็ง 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บส่วนใสที่ได้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร สกัดด้วย phenol-chloroform-isoamy alcohol (25:24:1) 1 ปริมาตร และผสมโดยการคว่ำหงายหลอดเบา ๆ เป็นเวลา 10 นาที และนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยเก็บส่วนใส 400 ไมโครลิตร และเติม TE 100 ไมโครลิตร เพื่อปรับปริมาตรเป็น 500 ไมโครลิตร และสกัดซ้ำอีก 1 รอบ จากนั้นสกัดด้วย chloroform-isoamy alcohol (24:1) 1 ปริมาตร และผสมโดยการคว่ำหงายหลอดเบา ๆ เป็นเวลา 10 นาที และนำมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยเก็บส่วนใสปริมาตร 300 ไมโครลิตร และนำมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตท

5.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ในตัวอย่างลำไส้ได้ดัดแปลงจากวิธีการของ Don *et al.*, (1991); Muyzer *et al.* (1993); Janse *et al.* (2004) ทำโดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาณ 1 ไมโครลิตร มาผสมกับน้ำดีไอออไนซ์ 10.5 ไมโครลิตร และนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยเป็นขั้นตอนการทำ hot start ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำมาแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย PCR reaction ปริมาตร 13.5 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยไพรเมอร์ gc338f (CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGG GCACGGGGGG ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG) ความเข้มข้น 5 พิโคโมล ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ 518r (ATT ACC GCG GCT GCT GG) ความเข้มข้น 5 พิโคโมล ปริมาตร 4 ไมโครลิตร สารละลาย dNTP ความเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร 10 x Taq buffer (Dynazyme) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) (Dynazyme) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.75 ไมโครลิตร เอนไซม์ Taq polymerase (Dynazyme II) ความเข้มข้น 2 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และน้ำปราศจากไอออน 1.25 ไมโครลิตร และนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยมีขั้นตอนของโปรแกรมดังนี้

denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที โดยกำหนดให้เครื่องทำงานด้วยโปรแกรมที่มีการ annealing ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จำนวน 2 รอบ และในรอบต่อไปให้ลดอุณหภูมิเป็น 64 องศาเซลเซียส จำนวน 2 รอบ และทำการลดอุณหภูมิลงไปเรื่อยๆ (touch-down) จนถึง 56 องศาเซลเซียส มีจำนวนรอบทั้งหมด 20 รอบ ต่อด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 10 รอบ และขั้นตอนสุดท้าย คือ primer extension ที่

5.3 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

DGGE คัดแปลงจากวิธีการของ Ampe *et al.* (1999); Bowman *et al.* (2003) โดยการเตรียมเจลที่มีความเข้มข้นของสารดีแอนูแลนท์ในช่วง 35 % - 60 % เริ่มจากการเตรียมกระจก โดยทำความสะอาดตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ คือ น้ำยาทำความสะอาด น้ำ และ absolute ethanol จากนั้นตั้งกระจกบนฐานสำหรับการบรรจุเจล หลังจากนั้นเตรียมสารละลายเจลโดยมีองค์ประกอบดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเจล DGGE

Chemical	0 % denaturant	35 % denaturant	60 % denaturant
urea (g)	-	1.59	2.72
8 % Polyacrylamide gel (ml)	2.1	2.1	2.1
20 x TAE buffer (ml)	0.54	0.54	0.54
formamide (ml)	-	1.5	2.6
deionized water (ml)	8.16	5.07	2.84

การบรรจุเจลเริ่มจากนำสารละลายดีแอนูแลนท์ 0% 1 มิลลิลิตร ใส่ใน eppendorf และเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10% 9.36 ไมโครลิตร และ temed 0.936 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบรรจุลงสู่แผ่นกระจก ทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายดีแอนูแลนท์ 35% 10.8 มิลลิลิตร เติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10% 93.6 ไมโครลิตร และ temed 9.36 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและเทใส่ gradient former ในส่วนของสารละลายความเข้มข้นต่ำและผสมสารละลายดีแอนูแลนท์ 65% เช่นเดียวกัน และเทใส่ในส่วนของสารละลายความเข้มข้นสูง จากนั้นทำการบรรจุสารละลายลงสู่กระจกโดยใช้แกรเดียนฟอร์มเมอร์ เมื่อเสร็จแล้วเติมสารละลายไอโซบิวทานอล 1 มิลลิลิตร เพื่อปิดทับผิวหน้าเจลทิ้งไว้เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นใช้เข็มดูดส่วนของไอโซบิวทานอลออก และซับด้วยกระดาษไนโตรเซลลูโลส ไล่หัวลงสู่ส่วนบนของกระจก และนำสารละลายดีแอนูแลนท์ 0% ที่เหลือ นำมาเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10% 93.6 ไมโครลิตร และ temed 9.36 ไมโครลิตร และบรรจุลงสู่

กระจก หุ้มกระจกด้วยฟิล์มพลาสติกและกระดาษชุบน้ำเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำออกจากเจลและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 คืน เมื่อจะทำการวิเคราะห์ตัวอย่างให้ทำความสะอาดเวลด์โดยนำหัวออกและฉีดล้างด้วย 1 x TAE นำเจลประกบลงบนคอร์และนำไปใส่ในถังที่บรรจุ 1 x TAE buffer อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทำการรันด้วยกระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับ 6 x loading dye 4 ไมโครลิตร โหลดลงสู่เจล และโหลดตัวอย่าง PCR product ของจุลินทรีย์เปรียบเทียบกับ ได้แก่ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 *Salmonella Enteritidis* S003 *Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus salivarius* KUB-AC21 และ *Escherichia coli* E010 เพื่อใช้เปรียบเทียบผล โดยใช้ตัวอย่างจุลินทรีย์ชนิดละ 5 ไมโครลิตร เมื่อโหลดตัวอย่างเรียบร้อยแล้วจึงเริ่มทำการรันด้วยกระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 4.5 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลมาข้อมด้วย 1 x SYBR gold nucleic acid gel stain (Molecular probe) เป็นเวลา 20 นาที

5.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA ของจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอจากเจล DGGE คัดแปลงจากวิธีการของ Zhu *et al.* (2002); Bowman *et al.* (2003) ตัดเจล DGGE บริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ โดยใช้ปากคีบที่ปราศจากเชื้อ นำชิ้นเจลใส่ใน eppendorf และเติมน้ำดีไอออไนซ์ 100 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำสารละลายดีเอ็นเอที่ 10 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการ 5.2 นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องโดยการรัน DGGE เทียบกับตัวอย่างเดิมที่ตัด เมื่อตรวจสอบความถูกต้องและความบริสุทธิ์แล้วทำการเพิ่มปริมาณตัวอย่างดีเอ็นเอโดยทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ 338f และ 518r นำ PCR product ที่ได้ทำบริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin Extract และตรวจสอบความเข้มข้นของตัวอย่างโดยรันเทียบกับ lamda DNA โดยต้องการตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ และตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์จากลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำ blast search จากฐานข้อมูลทางอิลเกทรอนิก www.ncbi.nlm.nih.gov และทำการวิเคราะห์กลุ่มจุลินทรีย์ด้วยวิธี Phylogenetic tree ทำโดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ เข้าสู่การทำ Phylogenetic tree โดยโปรแกรม Genebee จากฐานข้อมูล www.genebee.msu.su โดยกำหนดค่า Bootstrap เป็น 100

ผลและวิจารณ์

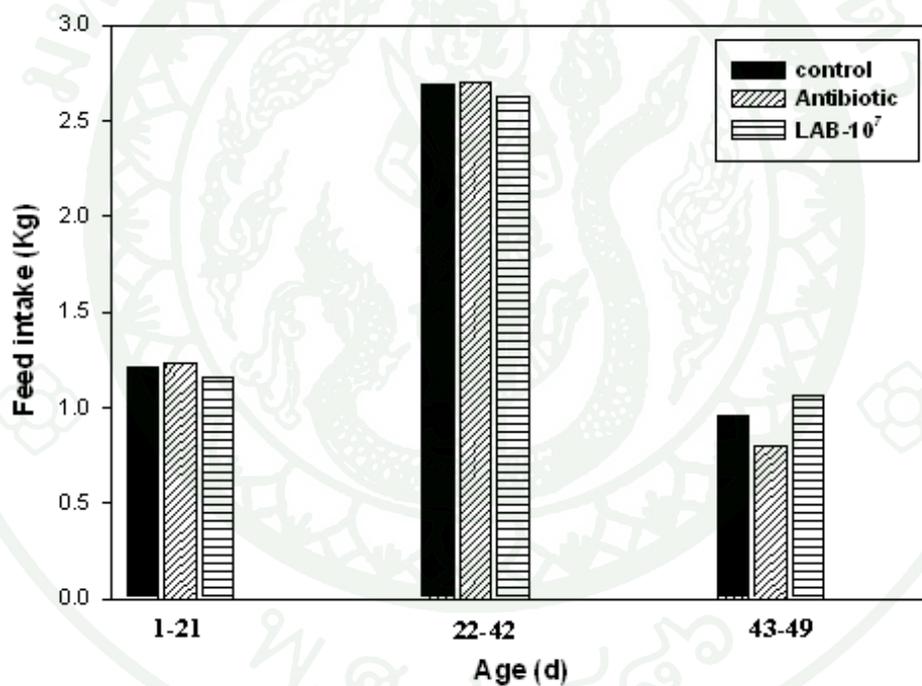
การศึกษาผลของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ที่แยกได้จากไก่เนื้อในประเทศไทย ต่อการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของวิลลัส ปริมาณจุลินทรีย์ และการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ของไก่เนื้อ โดยทำการศึกษาในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม เนื่องจากเป็นตำแหน่งที่มีความสำคัญในการดูดซึมสารอาหาร (Sun, 2004)

1. การศึกษาผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 และยาปฏิชีวนะต่อไก่เนื้อ

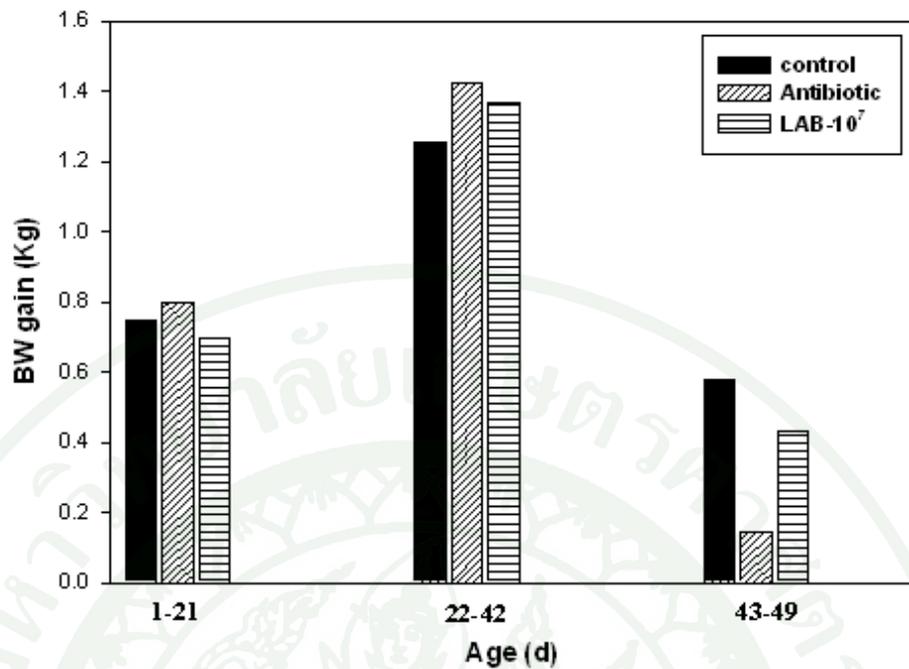
ในการทดลองนี้ใช้ไก่พันธุ์ Arbor Acres อายุ 1 วัน แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ให้ อาหารผงสูตรควบคุม (control) กลุ่มที่ 2 ให้อาหารผงผสม avilamycin 0.005 มิลลิกรัมต่อกรัม อาหาร (avilamycin) และกลุ่มที่ 3 ให้อาหารผงผสมเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ห่อหุ้มเซลล์ ด้วยอัลจินตที่มีปริมาณของเชื้อ 10^7 CFU ต่อกรัมอาหาร (LAB- 10^7) โดยให้ในช่วงอายุ 1-42 วัน และให้อาหารสูตรควบคุมในช่วงอายุ 43-49 วัน สำหรับการเตรียมเซลล์ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ทำโดยใช้วิธีการห่อหุ้มเซลล์ด้วยอัลจินต 2% ได้ปริมาณเซลล์ที่อยู่ในเม็ดบีด 2.4×10^9 CFU ต่อกรัม ผสมในอาหารผงให้ได้ปริมาณเชื้อ 10^7 CFU ต่อกรัม

1.1 ผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 และยาปฏิชีวนะต่อการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ

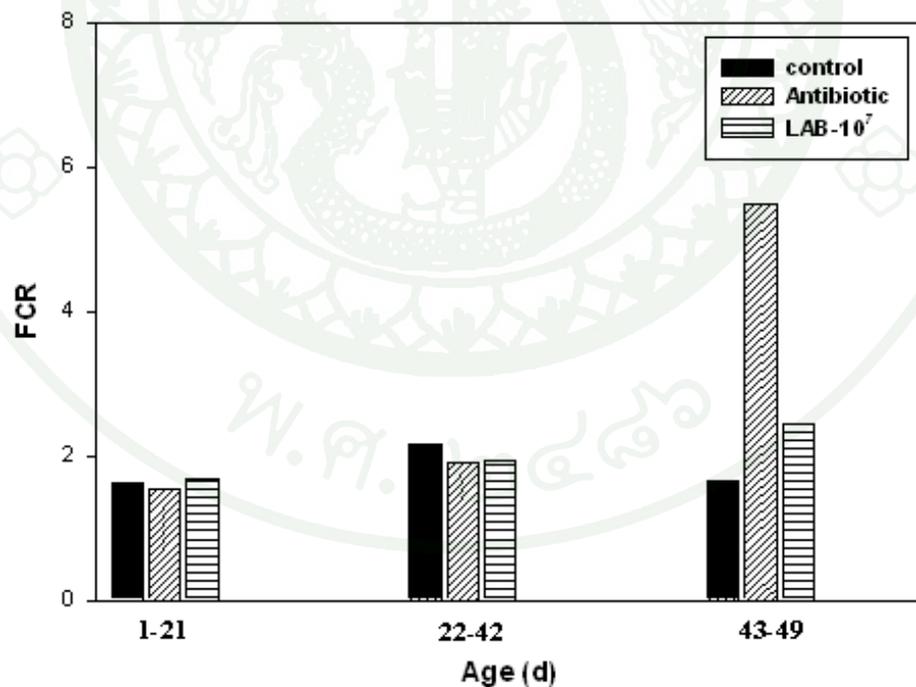
ทำการทดลองเลี้ยงไก่พันธุ์ Arbor Acres และเก็บข้อมูลน้ำหนักอาหารและน้ำหนักตัวไก่ 3 ช่วงอายุ คือ 1-21 22-42 และ 43-49 วัน จากผลการทดลองพบว่าปริมาณอาหารที่กิน ดังแสดงในภาพที่ 4 พบว่าในช่วงอายุ 1-21 วัน กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่ม LAB- 10^7 มีปริมาณการกินอาหาร 1.214 1.227 และ 1.162 กิโลกรัม ตามลำดับ ในช่วงอายุ 22-42 วัน กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่ม LAB- 10^7 มีปริมาณการกินอาหาร 2.693 2.704 และ 2.627 กิโลกรัม ตามลำดับ และในระยะสุดท้ายคือ ช่วงอายุ 43-49 วัน กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่ม LAB- 10^7 มีปริมาณการกินอาหาร 0.960 0.800 และ 1.060 กิโลกรัม ตามลำดับ สำหรับค่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 5 พบว่าในช่วงอายุ 1-21 วัน กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่ม LAB- 10^7 มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นเป็น 0.749 0.799 และ 0.696 กิโลกรัม ตามลำดับ ในช่วงอายุ 22-42 วัน กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่ม LAB- 10^7 มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นเป็น 1.252 1.423 และ 1.365 กิโลกรัม ตามลำดับ และ



ภาพที่ 4 ปริมาณอาหารที่กิน (Feed intake) ของไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5



ภาพที่ 5 น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (Body weight gain) ของไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5



ภาพที่ 6 อัตราการเปลี่ยนอาหาร (Feed conversion ratio) ของไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5

จากผลการเจริญเติบโตของไก่ตลอดช่วงอายุ 1-49 วัน ดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าไก่มีสุขภาพดีทุกกลุ่มไม่พบการตายของไก่ และเมื่อพิจารณาผลการกินอาหารและน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นตลอดช่วงอายุ 1-49 วัน พบว่าปริมาณอาหารที่กินของกลุ่ม LAB-10⁷ และกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ เป็น 4.849 และ 4.731 กิโลกรัม ตามลำดับ และมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเป็น 2.495 และ 2.368 กิโลกรัม ตามลำดับ และมีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็น 1.943 และ 1.998 ตามลำดับ จากผลการกินอาหาร น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเปลี่ยนอาหารพบว่ากลุ่ม LAB-10⁷ ให้ผลที่ดีกว่ากลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ แสดงว่า *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 มีแนวโน้มของการส่งเสริมการเจริญเติบโตของไก่ได้ดีกว่ากลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ avilamycin แต่เมื่อเปรียบเทียบผลของกลุ่ม LAB-10⁷ กับกลุ่มควบคุม พบว่ากลุ่ม LAB-10⁷ มีแนวโน้มของการเจริญเติบโตได้น้อยกว่ากลุ่มควบคุม

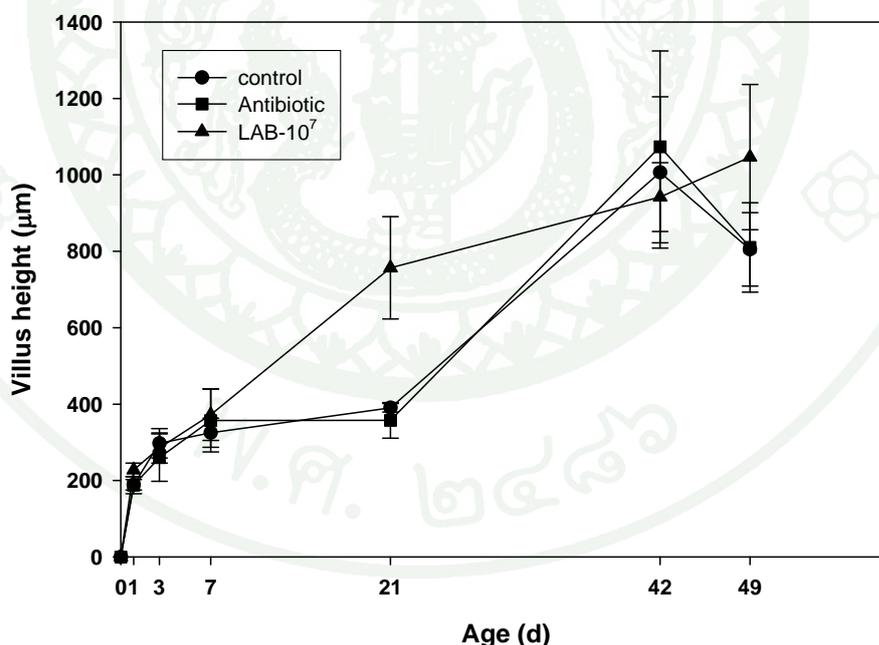
ตารางที่ 5 ผลการเจริญเติบโตของไก่ที่ได้รับอาหารสูตรควบคุม อาหารผสมยาปฏิชีวนะ และอาหารผสมโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ในช่วงอายุ 1-49 วัน

	ควบคุม	ยาปฏิชีวนะ	LAB-10 ⁷
ปริมาณอาหารที่กิน (กิโลกรัม)	4.867	4.731	4.849
น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กิโลกรัม)	2.581	2.368	2.495
อัตราการเปลี่ยนอาหาร	1.886	1.998	1.943
อัตราการตาย (%)	0	0	0

1.2 ผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 และยาปฏิชีวนะต่อความสูงของวิลลัสในลำไส้เล็กส่วนเจริญนมของไก่เนื้อ

จากผลการทดลองดังภาพที่ 7 ในไก่อายุ 1 วัน ที่ได้รับข้าวโพดป่นและน้ำดื่มเหมือนกันทุกกลุ่ม มีความสูงของวิลลัสใกล้เคียงกัน หลังจากนั้นพบว่าในไก่อายุ 3 วัน มีความสูงของวิลลัสเพิ่มขึ้น เมื่ออายุ 7 วัน พบว่ากลุ่ม LAB-10⁷ มีการส่งเสริมการเจริญของวิลลัสได้ดีกว่ากลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มควบคุม และเมื่อมีอายุ 21 วัน พบการเจริญของวิลลัสที่เพิ่มจากที่อายุ 7 วัน ได้อย่างชัดเจน โดยกลุ่มของ LAB-10⁷ สามารถส่งเสริมการเจริญของวิลลัสได้ดีกว่ากลุ่มอื่นเช่นเดียวกับผลการทดลองที่ 7 วัน แต่เมื่ออายุ 42 วันพบว่ากลุ่มควบคุมและที่ให้ยา

ปฏิชีวนะ มีความสูงของวิลลัสมากกว่ากลุ่ม LAB-10⁷ แต่จะลดลงในช่วงเวลา 42-49 วัน ในขณะที่กลุ่ม LAB-10⁷ ยังคงมีความสูงของวิลลัสเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงทำให้ที่อายุ 49 วัน พบว่ากลุ่มของ LAB-10⁷ มีความสูงของวิลลัสมากที่สุด คือ $1,046.25 \pm 190.15$ ไมครอน และจากผลการทดลองที่พบว่าความสูงของวิลลัสในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะมีความสูงของวิลลัสลดลงในช่วง 42-49 วัน ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Sun *et al.* (2005) ที่พบว่าไก่อายุ 35-49 วัน กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ lincomycin มีความสูงของวิลลัสในลำไส้เล็กส่วนดูโอดินัม และไอเรียมลดลง แต่พบว่าไก่อกลุ่มที่ให้จุลินทรีย์ โปรไบโอติก All-Lac XCL ซึ่งประกอบด้วย *Lactobacillus Enterococcus* และ *Pediococcus* มีความสูงของวิลลัสในส่วนดูโอดินัมคงที่และในส่วนไอเรียมเพิ่มขึ้น ซึ่งจากผลการทดลองนี้ แสดงว่า *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 สามารถส่งเสริมให้วิลลัสมีการพัฒนาได้ดี ซึ่งพบการส่งเสริมของเชื้อชนิดนี้ได้เช่นกันในงานทดลองของ Edens *et al.* (1997) และจากการที่ไก่อมีความสูงของวิลลัสเพิ่มขึ้นจึงทำให้มีพื้นที่ในการดูดซึมสารอาหารได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ไก่อมีการเจริญได้ดีขึ้น (Casparly, 1992; Yoruk *et al.*, 2004)

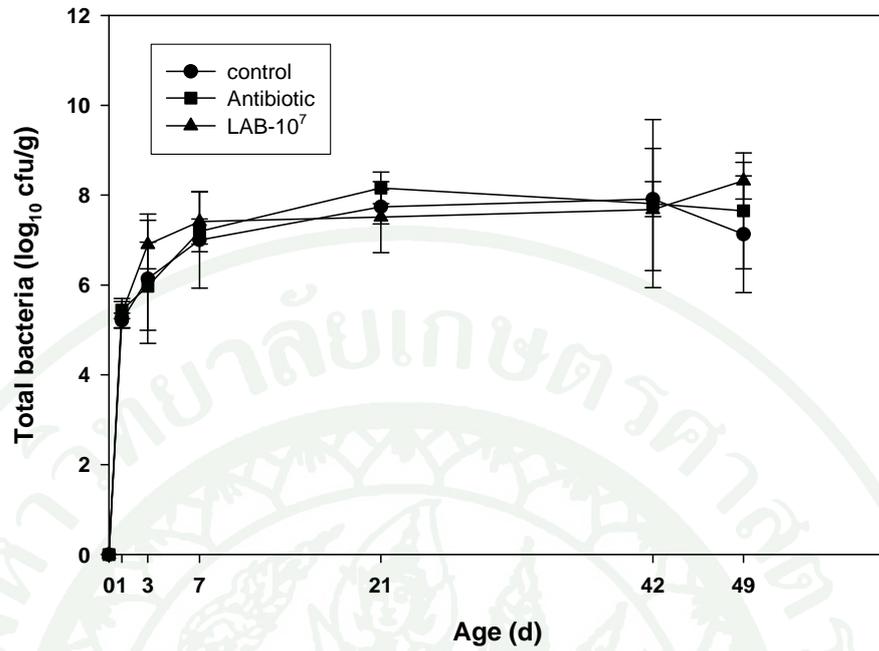


ภาพที่ 7 ความสูงของวิลลัสในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมของไก่อกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5

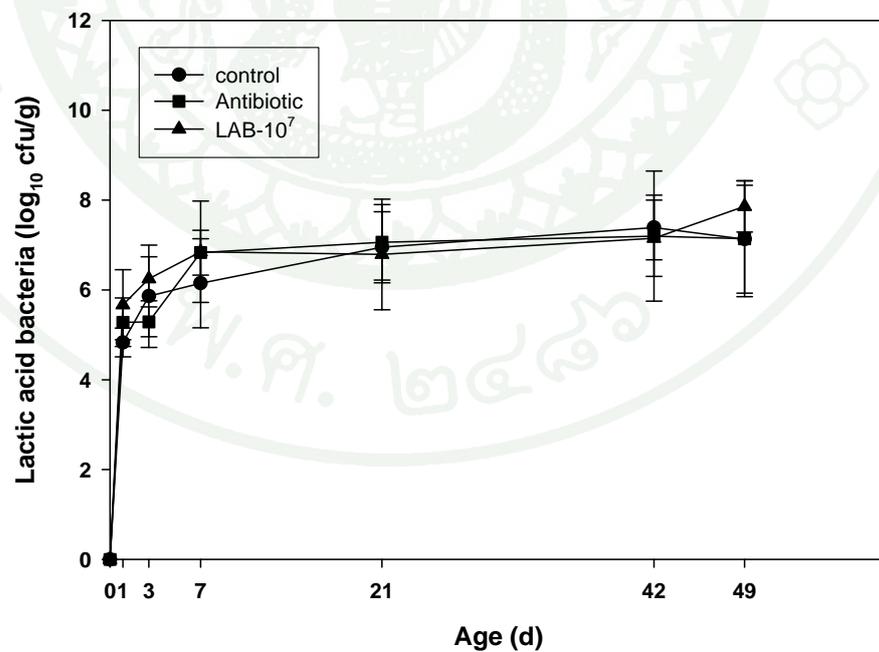
1.3 ผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 และยาปฏิชีวนะต่อปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กส่วนเจริญนมของไก่เนื้อ

จากการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนอาหาร BHI พบว่าในไก่อายุ 1 วัน ที่ได้รับข้าวโพดปนและน้ำดื่มเหมือนกันทุกกลุ่ม มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดใกล้เคียงกัน และมีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกกลุ่มเมื่ออายุ 3, 7 และ 21 วัน ดังแสดงในภาพที่ 8 สำหรับการเปลี่ยนแปลงในช่วงอายุ 21-42 วัน พบว่ากลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดลดลง แต่กลุ่มอื่นยังคงเพิ่มขึ้น และที่อายุ 43-49 วัน ให้อาหารสูตรควบคุมเหมือนกันทุกกลุ่ม พบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดลดลง ในขณะที่กลุ่ม LAB-10⁷ มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นและมีปริมาณมากที่สุดเป็น $8.32 \pm 0.41 \log_{10}$ CFU ต่อกรัม แสดงว่ากลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ยังคงมีผลในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดแม้ว่าจะหยุดการให้เชื้อแล้ว

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกดังแสดงในภาพที่ 9 พบว่าในไก่เมื่อมีอายุเพิ่มขึ้นจะมีปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกเพิ่มขึ้นโดยตลอด และพบว่าในช่วงอายุ 43-49 วัน กลุ่ม LAB-10⁷ ยังคงมีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่สำหรับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ มีปริมาณลดลง จึงทำให้ที่อายุ 49 วัน กลุ่ม LAB-10⁷ มีปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกมากที่สุดเป็น $7.86 \pm 0.57 \log_{10}$ CFU ต่อกรัม จากผลของอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์พบว่า avilamycin และ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 มีผลในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดในไก่ สำหรับการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกพบได้เฉพาะในกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5



ภาพที่ 8 ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมของไก่อกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะและกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5



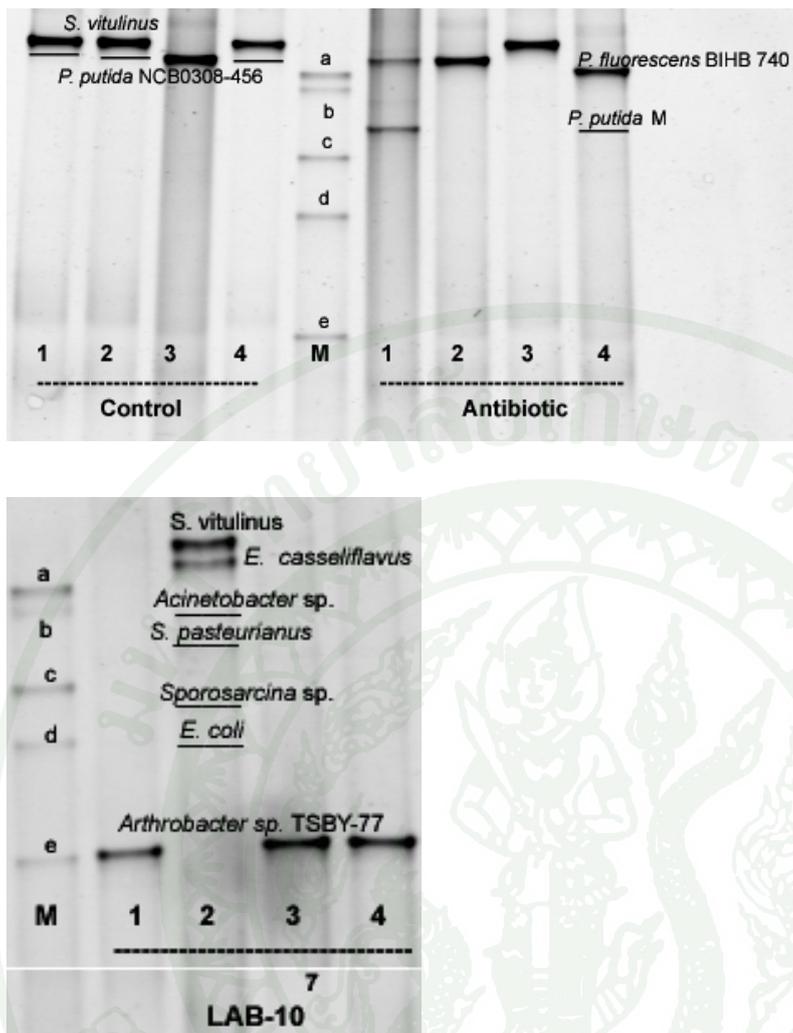
ภาพที่ 9 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมของไก่อกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะและกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5

1.4 ผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 และยาปฏิชีวนะต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดของจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กส่วนเจริญนมของไก่เนื้อ โดยวิธี PCR-DGGE

ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่ทั้ง 3 กลุ่มทดลอง โดยวิธี PCR-DGGE พบว่าในไก่อายุ 1 วัน ที่ให้ข้าวโพดป่นและน้ำดื่มก่อนการให้อาหารที่เสริมยาปฏิชีวนะ และโปรไบโอติก มีจุลินทรีย์ที่พบดังแสดงในภาพที่ 10 และตารางที่ 6 โดยจุลินทรีย์ที่พบได้ในทุกกลุ่มคือ *Staphylococcus vitulinus* นอกจากนี้ยังพบเชื้อชนิดอื่น ได้แก่ *Pseudomonas* ซึ่งมีสปีชีส์ที่พบแตกต่างกันไป โดยในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะพบ *Pseudomonas putida* NCB0308-456 กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะพบ *Pseudomonas fluorescens* และ *Pseudomonas putida* M สำหรับกลุ่มที่ให้โปรไบโอติกพบ *Enterococcus casseliflavus* *Streptococcus pasteurianus* *Acinetobacter* sp. *Arthrobacter* sp. *Escherichia coli* และ *Sporosarcina* sp. จากผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ที่พบในไก่แต่ละกลุ่มก่อนการได้รับอาหารมีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก และกลุ่มที่ให้โปรไบโอติกสามารถพบ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคติดมากับลูกไก่ด้วย

ในไก่อายุ 3 วัน หลังจากได้รับอาหารที่ให้ยาปฏิชีวนะ หรือ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 พบว่าความหลากหลายของจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่มลดลงจากที่อายุ 1 วัน และพบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะมีจุลินทรีย์ที่คล้ายคลึงกัน ดังแสดงในภาพที่ 11 และตารางที่ 7

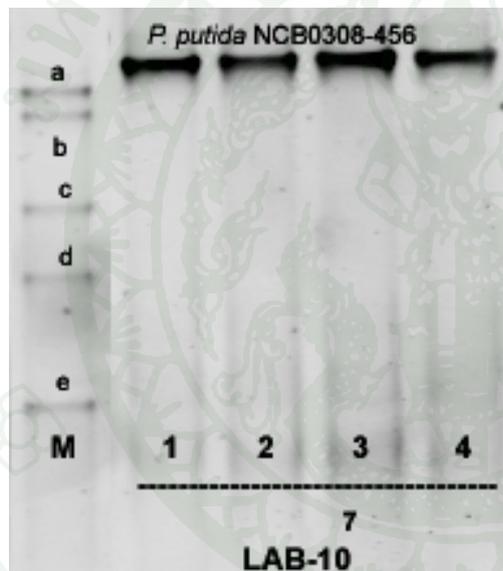
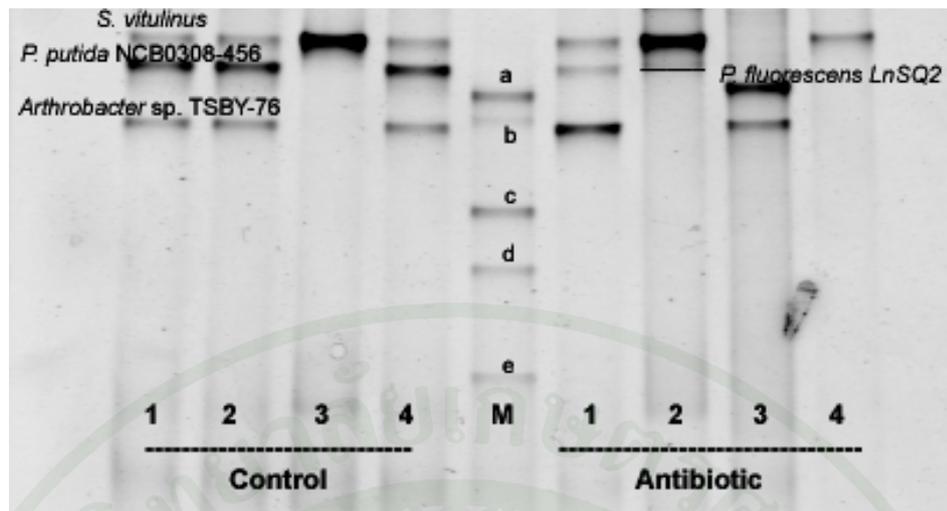
ในไก่อายุ 7 วัน จุลินทรีย์ที่พบในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้โปรไบโอติกมีความคล้ายคลึงกัน ดังแสดงในภาพที่ 12 และ ตารางที่ 8 แต่กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะมีจุลินทรีย์ที่พบได้แตกต่างจากกลุ่มอื่น คือ พบ Uncultured *Pseudomonadaceae* *Lactobacillus reuteri* PIL73 และ LP970 สำหรับจุลินทรีย์ที่พบในทุกกลุ่ม คือ *Pseudomonas* sp. *Pseudomonas fluorescens* และ *Staphylococcus vitulinus* และพบ *Enterococcus faecium* ในทุกกลุ่มยกเว้นกลุ่ม avilamycin เนื่องจากเชื้อชนิดนี้ถูกยับยั้งได้โดยยาปฏิชีวนะ avilamycin (Bataye et al., 2005) สำหรับในกลุ่ม LAB-10⁷ พบ *Enterococcus faecium* ได้ในไก่ 100% แสดงว่า *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 มีผลส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Enterococcus faecium* ได้ จากการศึกษาของ McDermott et al. (2005) รายงานว่า *Enterococcus faecium* พบได้ในไก่ภายใน 7 วันหลังจากที่ไก่ฟักตัว และเป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็น โปรไบโอติกได้ ดังนั้นการพบเชื้อดังกล่าวจึงน่าจะส่งผลดีต่อสุขภาพของไก่



ภาพที่ 10 PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 อายุ 1 วัน โดยใช้เชื้อเปรียบเทียบ ได้แก่ a : *L. acidophilus* b : *L. salivarius* KUB-AC21 c : *L. reuteri* KUB-AC5 d : *E. coli* E010 และ e : *S. Enteritidis* S003

ตารางที่ 6 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 อายุ 1 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)		
	ควบคุม	ยาปฏิชีวนะ	LAB-10 ⁷
แบคทีเรียกรดแลคติก			
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	0	0	25
<i>Streptococcus pasteurianus</i>	0	0	25
จุลินทรีย์ชนิดอื่น			
<i>Acinetobacter</i> sp.	0	0	25
<i>Arthrobacter</i> sp.	0	0	75
<i>Escherichia coli</i>	0	0	25
<i>Pseudomonas putida</i> M	0	50	0
<i>Pseudomonas putida</i> NCB0308-456	100	50	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	25	0
<i>Sporosarcina</i> sp.	0	0	25
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	75	25	25



ภาพที่ 11 PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 อายุ 3 วัน โดยใช้เชื้อเปรียบเทียบ ได้แก่ a : *L. acidophilus* b : *L. salivarius* KUB-AC21 c : *L. reuteri* KUB-AC5 d : *E. coli* E010 และ e : *S. Enteritidis* S003

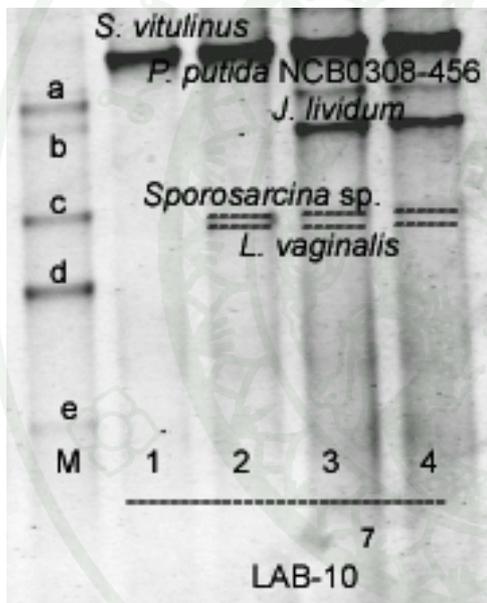
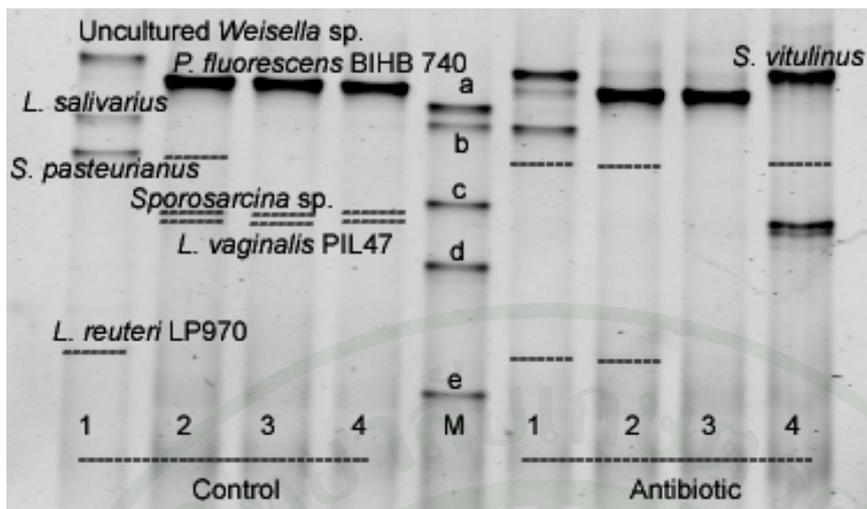
ตารางที่ 7 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 อายุ 3 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)		
	ควบคุม	ยาปฏิชีวนะ	LAB-10 ⁷
จุลินทรีย์ชนิดอื่น			
<i>Arthrobacter</i> sp.	0	25	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	25	0
<i>Pseudomonas putida</i>	75	50	100
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	100	75	0

ตารางที่ 8 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 (LAB-10⁷) อายุ 7 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)		
	ควบคุม	ยาปฏิชีวนะ	LAB-10 ⁷
แบคทีเรียกรดแลคติก			
<i>Enterococcus faecium</i>	50	0	100
<i>Lactobacillus reuteri</i> LP970	0	25	0
PIL73	0	25	0
จุลินทรีย์ชนิดอื่น			
<i>Pseudomonas</i> sp.	75	75	25
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	50	75	25
<i>Pseudomonadaceae</i>	0	25	0
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	100	100	100

ในไก่อายุ 21 วัน พบความแตกต่างของจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่มค่อนข้างมากดังแสดงในภาพที่ 13 และตารางที่ 9 ซึ่งแสดงถึงความจำเพาะของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ได้รับอาหารที่แตกต่างกัน สอดคล้องกับรายงานของ Amit-Romach *et al.* (2004) ซึ่งพบว่าไก่จะมีการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ที่ชัดเจนภายหลังจากอายุ 2 สัปดาห์ สำหรับจุลินทรีย์ที่พบได้ในทุกกลุ่มคือ *Lactobacillus vaginalis* และ *Sporosarcina* sp. จุลินทรีย์ที่พบเฉพาะในบางกลุ่มคือ *Weissella* sp. พบในกลุ่มควบคุม *Pseudomonas putida* และ *Janthinobacterium lividum* พบในกลุ่ม LAB-10⁷ นอกจากนี้ในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ พบเชื้อก่อโรค *Streptococcus pasteurianus* แต่ไม่พบใน LAB-10⁷ แสดงว่า *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าวได้ *Streptococcus pasteurianus* เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Streptococcus gallolyticus* ซึ่งประกอบด้วย 3 subspecies ได้แก่ *gallolyticus* *macedonicus* และ *pasteurianus* เป็นเชื้อก่อโรคที่ทำให้เกิดภาวะโลหิตเป็นพิษ (septicemia) โดยมีรายงานการพบในนกพิราบและพบการระบาดได้ในไก่กระทงทำให้มีอัตราการตายเพิ่มมากขึ้น (Vanrobaeys *et al.*, 1999; Baele *et al.*, 2002; Chadfield *et al.*, 2007)

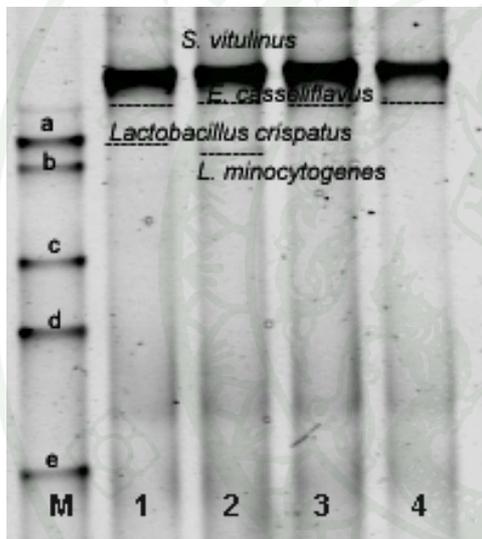
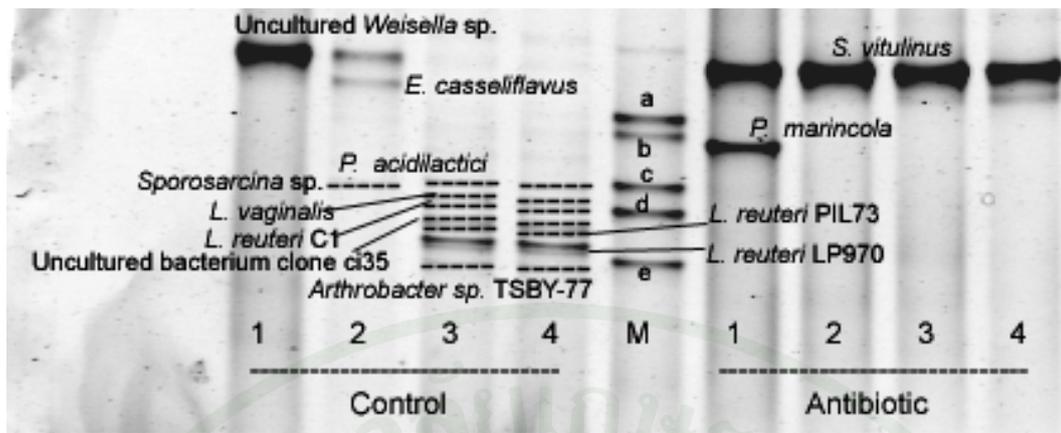


ภาพที่ 13 PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 อายุ 21 วัน โดยใช้เชื้อเปรียบเทียบ ได้แก่ a : *L. acidophilus* b : *L. salivarius* KUB-AC21 c : *L. reuteri* KUB-AC5 d : *E. coli* E010 และ e : *S. Enteritidis* S003

ตารางที่ 9 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 อายุ 21 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)		
	ควบคุม	ยาปฏิชีวนะ	LAB-10 ⁷
แบคทีเรียกรดแลคติก			
<i>Lactobacillus reuteri</i>	25	50	0
<i>Lactobacillus salivarius</i> KUB-AC21	0	25	0
PIL15	25	0	0
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	75	25	75
<i>Streptococcus pasteurianus</i>	50	75	0
<i>Weissella</i> sp.	25	0	0
จุลินทรีย์ชนิดอื่น			
<i>Janthinobacterium lividum</i>	0	0	50
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	50
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	75	75	0
<i>Sporosarcina</i> sp.	75	25	75
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	0	50	100

ในไก่อายุ 42 วัน พบความหลากหลายของจุลินทรีย์มากที่สุดในกลุ่มควบคุมแต่ในกลุ่มอื่นมีความหลากหลายน้อยโดยส่วนใหญ่พบจุลินทรีย์เพียง 2 ชนิด คือ *Enterococcus casseliflavus* และ *Staphylococcus vitulinus* ดังแสดงในภาพที่ 14 และตารางที่ 10 จุลินทรีย์ที่พบเฉพาะในบางกลุ่ม ได้แก่ *Psychrobacter marincola* ในกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และพบ *Lactobacillus crispatus* และ *Listeria monocytogenes* ในกลุ่ม LAB-10⁷



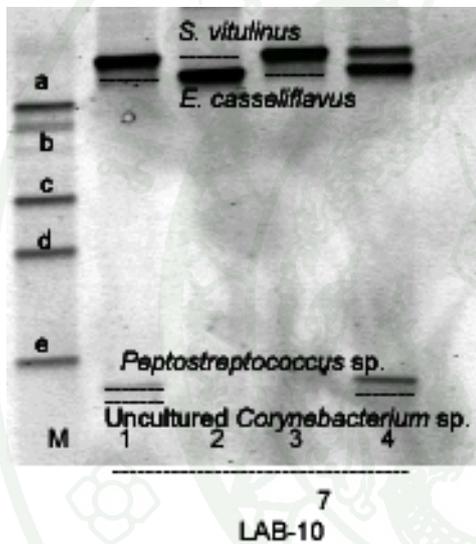
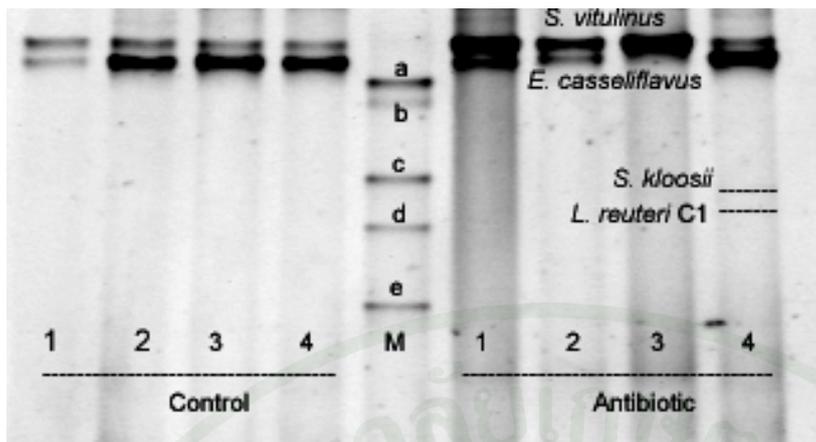
7
LAB-10

ภาพที่ 14 PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 อายุ 42 วัน โดยใช้เชื้อเปรียบเทียบ ได้แก่ a : *L. acidophilus* b : *L. salivarius* KUB-AC21 c : *L. reuteri* KUB-AC5 d : *E. coli* E010 และ e : *S. Enteritidis* S003

ตารางที่ 10 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 อายุ 42 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)		
	ควบคุม	ยาปฏิชีวนะ	LAB-10 ⁷
แบคทีเรียกรดแลคติก			
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	25	100	100
<i>Lactobacillus crispatus</i>	0	0	25
<i>Lactobacillus reuteri</i> PIL73	50	0	0
C1	50	0	0
LP970	50	0	0
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	50	0	0
<i>Pediococcus acidilactici</i>	50	0	0
<i>Weissella</i> sp.	50	0	0
จุลินทรีย์ชนิดอื่น			
<i>Arthrobacter</i> sp.	50	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	25
<i>Psychrobacter marincola</i>	0	25	0
<i>Sporosarcina</i> sp.	25	0	0
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	25	100	100
Uncultured bacterium clone ci35	50	0	0

เมื่อไก่อายุ 49 วัน พบว่าจากการให้อาหารสูตรควบคุมในทุกกลุ่มช่วง 43-49 วัน พบการเปลี่ยนแปลงมากในกลุ่มควบคุมโดยมีจุลินทรีย์ลดลงจาก 10 ชนิด ที่ 42 วัน เหลือเพียง 2 ชนิดเท่านั้น ดังแสดงในภาพที่ 15 และตารางที่ 11 โดยพบ *Enterococcus casseliflavus* และ *Staphylococcus vitulinus* ซึ่งพบได้ในทุกกลุ่ม สอดคล้องกับรายงานของ Murase *et al.* (2002) ซึ่งพบ *Enterococcus casseliflavus* ในตัวอย่างไก่ทุกตัวที่อายุ 42-49 วัน สำหรับจุลินทรีย์ที่พบเฉพาะในบางกลุ่ม ได้แก่ *Lactobacillus reuteri* และ *Staphylococcus kloosii* ในกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ พบ *Corynebacterium* sp. และ *Peptostreptococcus* sp. ในกลุ่ม LAB-10⁷



ภาพที่ 15 PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 อายุ 49 วัน โดยใช้เชื้อเปรียบเทียบ ได้แก่ a : *L. acidophilus* b : *L. salivarius* KUB-AC21 c : *L. reuteri* KUB-AC5 d : *E. coli* E010 และ e : *S. Enteritidis* S003

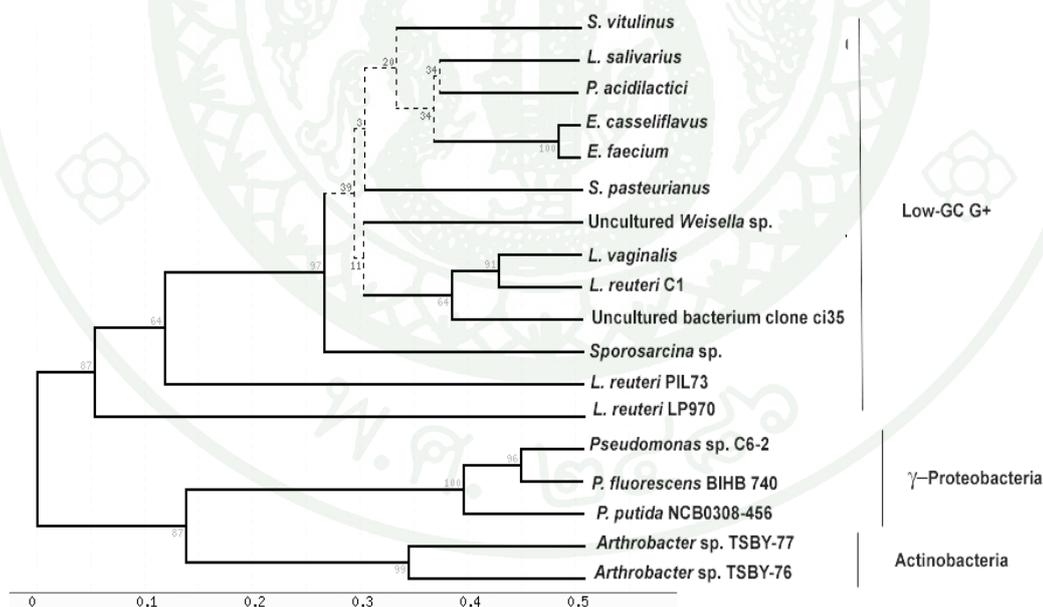
ตารางที่ 11 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 อายุ 49 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)		
	ควบคุม	ยาปฏิชีวนะ	LAB-10 ⁷
แบคทีเรียกรดแลคติก			
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	100	100	100
<i>Lactobacillus reuteri</i>	0	25	0
จุลินทรีย์ชนิดอื่น			
<i>Corynebacterium</i> sp.	0	0	50
<i>Peptostreptococcus</i> sp.	0	0	50
<i>Staphylococcus kioosii</i>	0	25	0
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	100	100	100

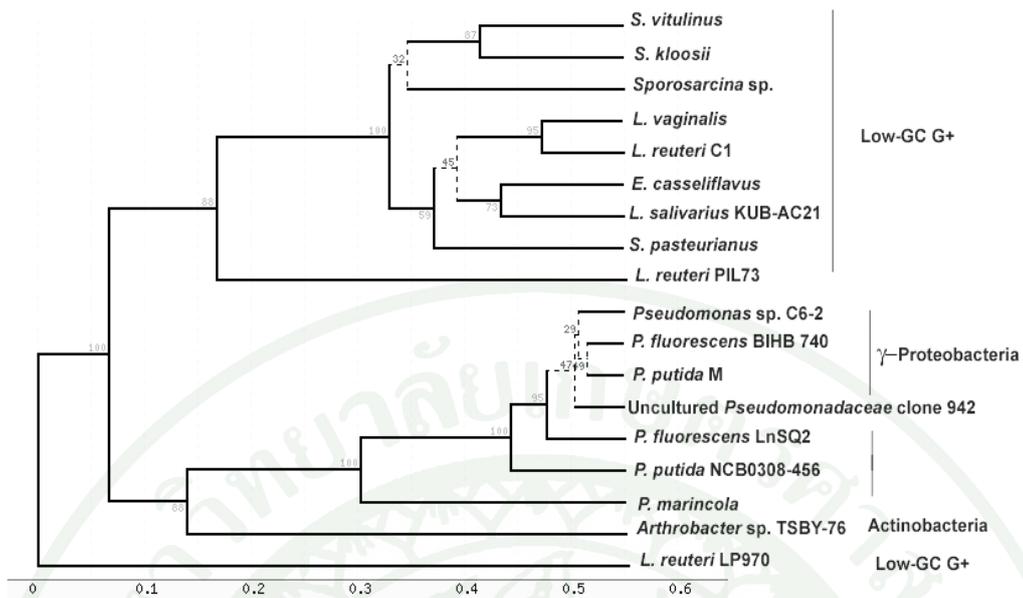
จากผล PCR-DGGE ตลอดช่วงอายุ 1-49 วัน ไม่พบ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ในไก่ แต่จากการเปรียบเทียบจุลินทรีย์ที่พบในกลุ่มควบคุมและกลุ่ม avilamycin พบว่ามีกลุ่มของจุลินทรีย์ในช่วงอายุ 1-49 วันที่แตกต่างกัน แสดงว่า avilamycin และ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pedrosa *et al.* (2006) ซึ่งพบว่าไก่ที่ให้ avilamycin มีการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในระบบลำไส้ได้แตกต่างจากกลุ่มควบคุม สำหรับกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 พบจำนวนชนิดของจุลินทรีย์ที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุม แสดงว่าเป็นผลมาจากการให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีปริมาณของเชื้อต่ำกว่า 10^8 CFU ต่อกรัม จึงไม่สามารถตรวจพบได้ด้วย PCR-DGGE เนื่องจากเทคนิค PCR-DGGE ไม่สามารถตรวจพบจุลินทรีย์ที่มีปริมาณน้อยกว่า 10^8 CFU ต่อกรัม ในตัวอย่างลำไส้ไก่ (Dumoncaux, *et al.*, 2006) และจากการทดลองนี้พบว่าการเลี้ยงในกรงแบตเตอรี่ (battery cages) ไม่พบการเจริญของเชื้อก่อโรค *Escherichia coli* และ *Salmonella* Enteritidis ซึ่งพบได้ในชุดทดลองที่ให้ *Salmonella* ซึ่งเป็นการเลี้ยงแบบพื้น (floor pens) สอดคล้องกับรายงานของ Willis *et al.* (2002) ที่พบว่าไก่ที่เลี้ยงแบบพื้นมีโอกาสที่พบการติดเชื้อก่อโรคได้มากกว่าการเลี้ยงแบบกรงแบตเตอรี่

1.5 Phylogenetic tree ของจุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5

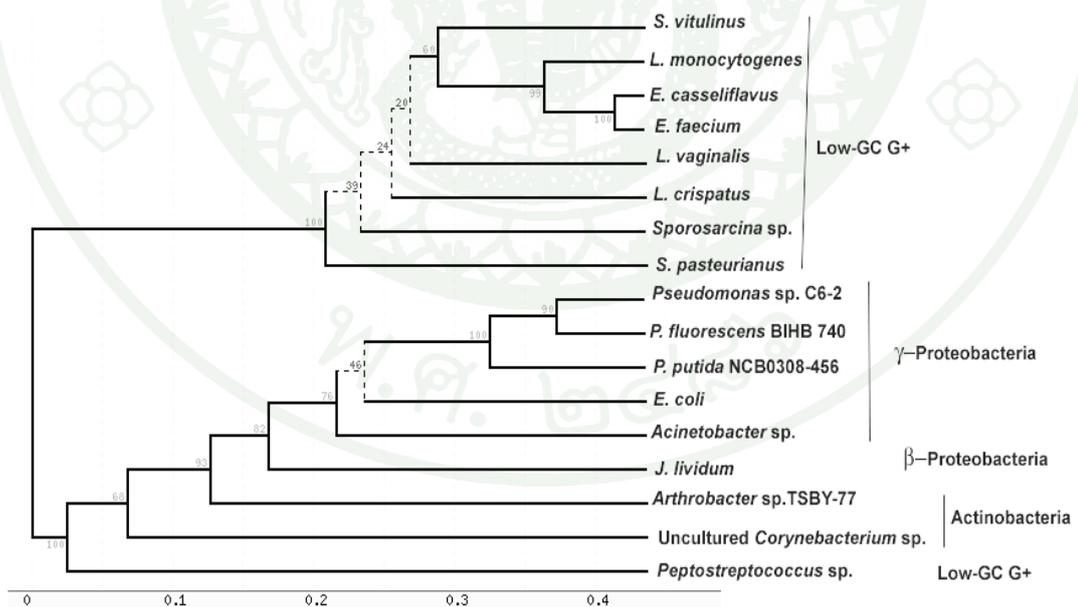
จากการพิจารณา phylogenetic tree พบว่ากลุ่มควบคุมมีจุลินทรีย์หลากหลายมากที่สุดโดยพบจุลินทรีย์ในกลุ่ม Low-GC G+ มากที่สุด ได้แก่ *Staphylococcus* *Lactobacillus* *Pediococcus* *Enterococcus* *Streptococcus* *Weissella* และ *Sporosarcina* สำหรับกลุ่มที่พบรองลงมาคือ γ -Proteobacteria และ Actinobacteria สำหรับกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะพบว่ามีจุลินทรีย์ในกลุ่มของ γ -Proteobacteria มากกว่าที่พบในกลุ่มควบคุม และสำหรับกลุ่ม LAB-10⁷ พบการเจริญของกลุ่ม Low-GC G+ มากที่สุด ได้แก่ *Staphylococcus* *Listeria* *Enterococcus* *Lactobacillus* *Sporosarcina* และ *Streptococcus* นอกจากนี้ยังพบการเจริญของ *Janthinobacterium lividum* ซึ่งเป็นกลุ่ม β -Proteobacteria และพบ *Corynebacterium* และ *Peptostreptococcus* ซึ่งไม่พบในกลุ่มอื่น แสดงถึงผลของการให้เชื้อ โปรไบโอติกที่มีอิทธิพลต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่ซึ่งแตกต่างจากที่พบในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ ดังแสดงในภาพที่ 16-18



ภาพที่ 16 Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในตัวอย่างลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม ช่วงอายุ 1-49 วัน



ภาพที่ 17 Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในตัวอย่างลำไส้ไก่กลุ่มที่ให้ยาปฏิชีวนะ ช่วงอายุ 1-49 วัน



ภาพที่ 18 Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในตัวอย่างลำไส้ไก่กลุ่มที่ให้โปรไบโอติก 10^7 cfu ต่อกรัม ช่วงอายุ 1-49 วัน

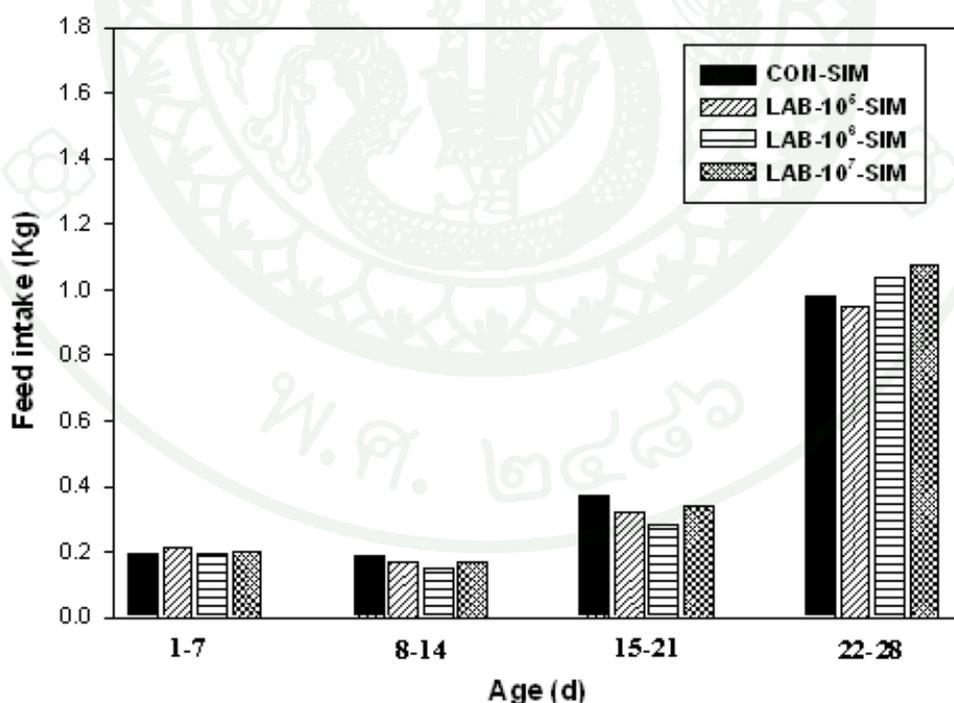
2. การศึกษาผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ต่อไก่เนื้อ ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 2 แบบ

การศึกษาผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 และ *Salmonella* Enteritidis S003 ต่อไก่เนื้อพันธุ์ Ross อายุ 1 วัน จำนวน 210 ตัว โดยแบ่งเป็น 7 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ไก่ที่ให้อาหารสูตรควบคุม (CON-SIM) และกลุ่มที่ 2-4 ไก่ที่ให้อาหารผสมโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ปริมาณ 10^5 (LAB- 10^5 -SIM) 10^6 (LAB- 10^6 -SIM) และ 10^7 (LAB- 10^7 -SIM) CFUต่อกรัม พร้อมทั้งให้เชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 ปริมาณ 10^6 CUFต่อตัว จัดเป็นชุดทดลองแบบ SIM และกลุ่มที่ 5-7 ให้อาหารผสมโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ปริมาณ 10^5 (LAB- 10^5 -SEP) 10^6 (LAB- 10^6 -SEP) และ 10^7 (LAB- 10^7 -SEP) CFUต่อกรัม หลังจากนั้น 2 วันจึงให้เชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 ปริมาณ 10^6 CUFต่อตัว จัดเป็นชุดทดลองแบบ SEP การให้อาหารผสมโปรไบโอติกในกลุ่มที่ 2-7 เป็นการให้อาหารผสมเชื้อโปรไบโอติกในช่วงอายุ 1-21 วัน และให้อาหารสูตรควบคุมในช่วงอายุ 22-28 วัน โดยใช้อาหารผงที่ผสมผงเชื้อแห้ง *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 โดยใช้วิธีการเตรียมเชื้อแห้งที่เพิ่มขึ้นตอนการทำให้เซลล์เข้มข้นก่อนโดยการนำน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์มีความเข้มข้นมากขึ้น 3 เท่า ก่อนนำไปทำแห้งโดยผสมนมผง 15 % พบว่าได้ปริมาณเชื้อในผงแห้ง 1×10^{10} cfu ต่อกรัม ซึ่งสามารถใช้ในการผสมในอาหารสำหรับการเลี้ยงไก่ในปริมาณไม่เกิน 1% ได้ ซึ่งการเติมสารเสริมในปริมาณไม่เกิน 1% จะไม่ส่งผลกระทบต่อคุณค่าทางโภชนาการในอาหาร

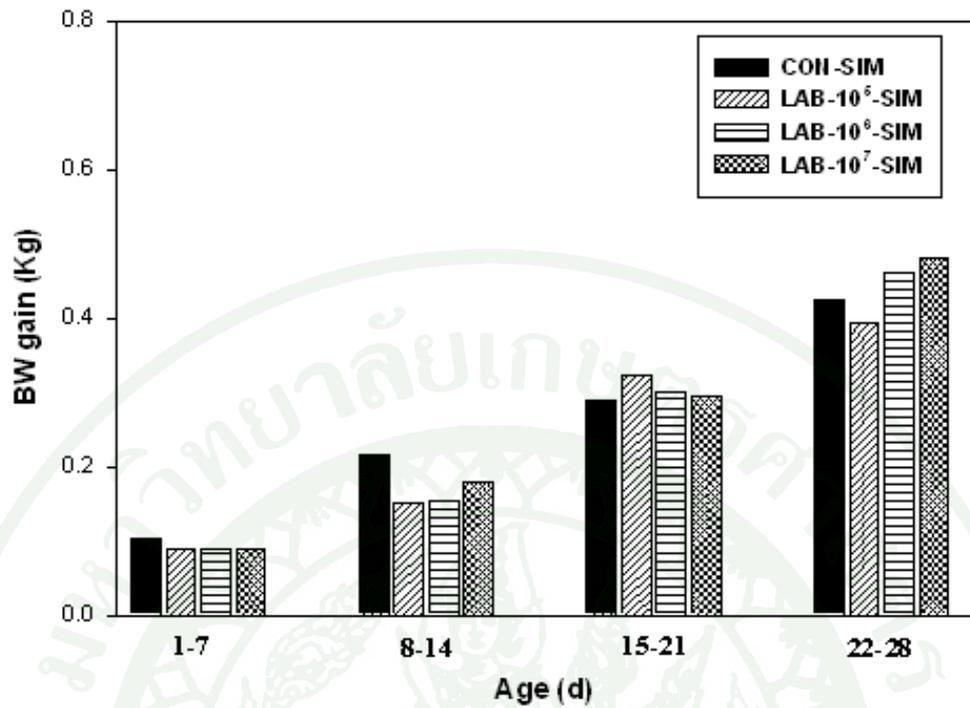
2.1 ผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 ต่อการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ

ในระหว่างการเลี้ยงไก่มีการบันทึกปริมาณการกินอาหาร และน้ำหนักตัวไก่ทุกสัปดาห์ เพื่อนำมาคำนวณหาค่าปริมาณอาหารที่กิน (Feed intake) น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (BW gain) และอัตราการเปลี่ยนอาหาร (FCR) จากภาพที่ 19 แสดงปริมาณการกินอาหารของไก่ในช่วงอายุต่างๆ ของกลุ่ม SIM พบว่าในช่วงอายุ 1-7 วัน และ 8-14 วัน ทุกกลุ่มมีการปริมาณอาหารที่กินใกล้เคียงกัน โดยมีปริมาณการกินอาหาร 0.19 - 0.2 กิโลกรัม และ 0.15-0.19 กิโลกรัมตามลำดับ แต่เมื่ออายุเพิ่มขึ้นในช่วง 15-21 วัน กลุ่ม CON-SIM และกลุ่ม LAB- 10^7 -SIM มีการกินอาหารได้มากกว่ากลุ่มอื่น และในช่วงอายุ 22-28 วัน พบว่ากลุ่มที่ให้โปรไบโอติกกลุ่ม LAB- 10^6 -SIM และ LAB- 10^7 -SIM มีแนวโน้มของการกินอาหารได้ดีกว่ากลุ่ม CON-SIM จากภาพที่ 20 แสดงการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นในช่วงอายุ 1-7 มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นได้

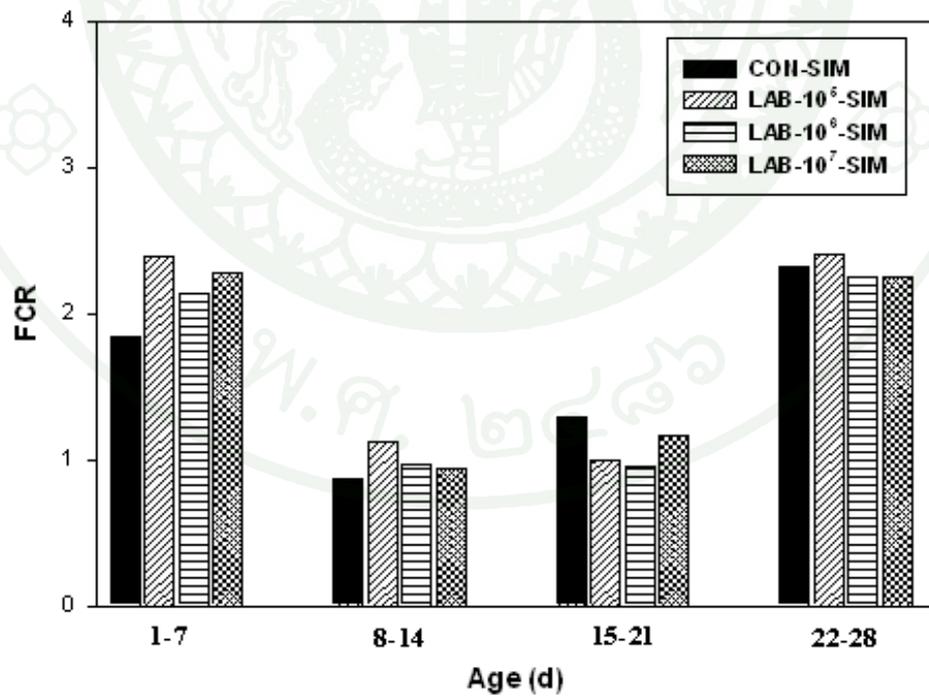
ใกล้เคียงกัน คือ 0.09-0.1 กิโลกรัม ในช่วงอายุ 8-14 วัน กลุ่ม CON-SIM มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นสูงกว่าอื่น ในช่วงอายุ 15-21 วัน กลุ่ม LAB-10⁵-SIM มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นมากที่สุด ส่วนกลุ่มอื่นมีค่าใกล้เคียงกัน และในช่วงอายุ 22-28 วัน กลุ่ม LAB-10⁶ และ LAB-10⁷ มีแนวโน้มของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นดีกว่ากลุ่ม CON-SIM ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณอาหารที่กิน เมื่อพิจารณาตลอดช่วงอายุ 1-28 วัน พบว่ากลุ่ม LAB-10⁷ มีการกินอาหารและมีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นได้ดีที่สุด คือ 1.788 และ 1.039 กิโลกรัม ตามลำดับ รองลงมาคือกลุ่ม CON-SIM LAB-10⁶-SIM และ LAB-10⁵-SIM ตามลำดับ และจากการคำนวณค่าอัตราการเปลี่ยนอาหาร (FCR) พบว่ากลุ่ม CON-SIM LAB-10⁵-SIM LAB-10⁶-SIM และ LAB-10⁷-SIM มีค่า FCR เป็น 1.662 1.726 1.656 และ 1.721 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 21 และตารางที่ 12 จากผลการทดลองทั้งหมดของกลุ่ม SIM พบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 มีปริมาณการกินอาหารและน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นได้แตกต่างกันในช่วงอายุ 8-28 วัน และพบว่า การให้เชื้อ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นในระดับ 10⁵ 10⁶ และ 10⁷ CFU ต่อกรัม มีผลต่อการส่งเสริมการกินอาหารและน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นได้ดียิ่งขึ้น โดยพบว่ากลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10⁷ CFU ต่อกรัม มีแนวโน้มของการส่งเสริมการกินอาหารและน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นของไก่ได้ดีที่สุด และกลุ่ม 10⁶ CFU ต่อกรัม มีอัตราการเปลี่ยนอาหารต่ำที่สุด



ภาพที่ 19 ปริมาณอาหารที่กิน (Feed intake) ของไก่กลุ่ม SIM



ภาพที่ 20 น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (BW gain) ของไก่กลุ่ม SIM

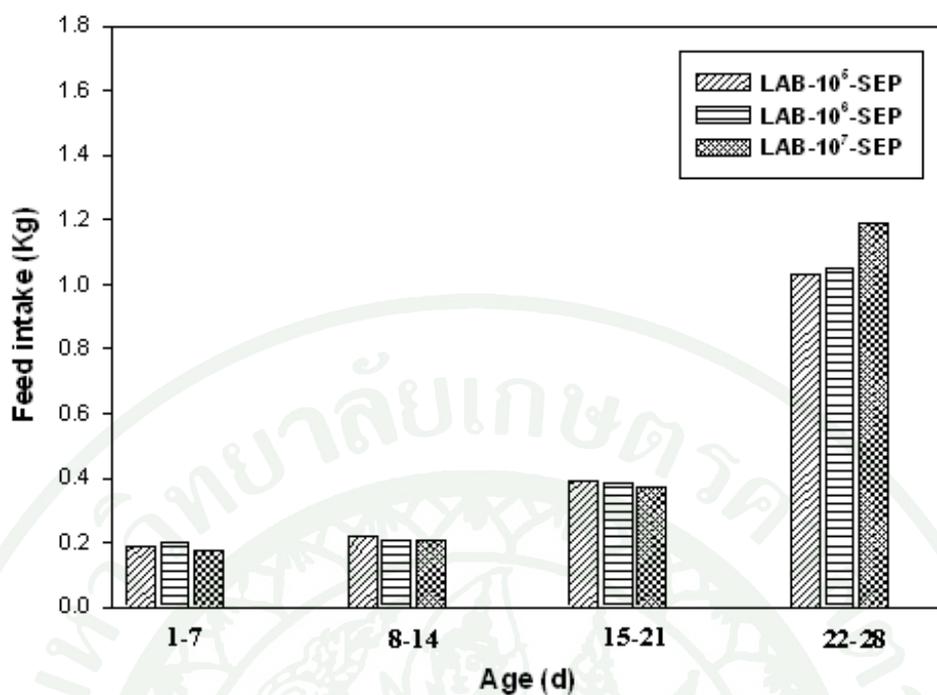


ภาพที่ 21 อัตราการเปลี่ยนอาหาร (FCR) ของไก่กลุ่ม SIM

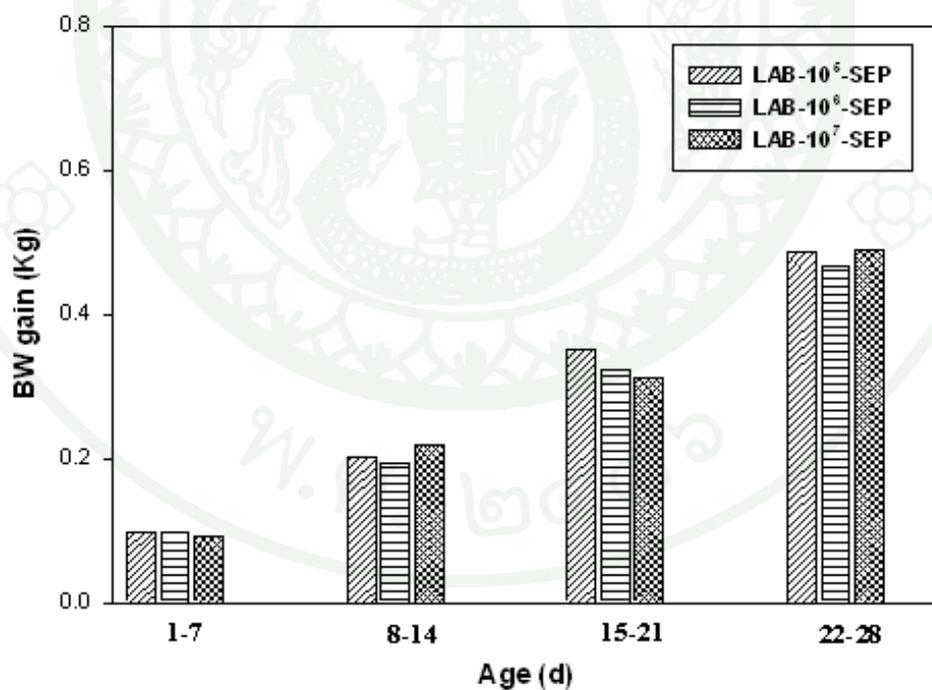
ตารางที่ 12 ผลการเจริญเติบโตของไก่ที่ให้โปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5
ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 2 แบบ

อาหาร	ปริมาณอาหารที่กิน (กิโลกรัม)	น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กิโลกรัม)	อัตราการเปลี่ยนอาหาร	อัตราการตาย (%)
CON-SIM	1.715	1.032	1.662	3.33
LAB-10 ⁵ -SIM	1.648	0.955	1.726	3.33
LAB-10 ⁶ -SIM	1.664	1.005	1.656	3.33
LAB-10 ⁷ -SIM	1.788	1.039	1.721	0
LAB-10 ⁵ -SEP	1.801	1.136	1.585	0
LAB-10 ⁶ -SEP	1.843	1.079	1.708	0
LAB-10 ⁷ -SEP	1.946	1.108	1.756	3.33

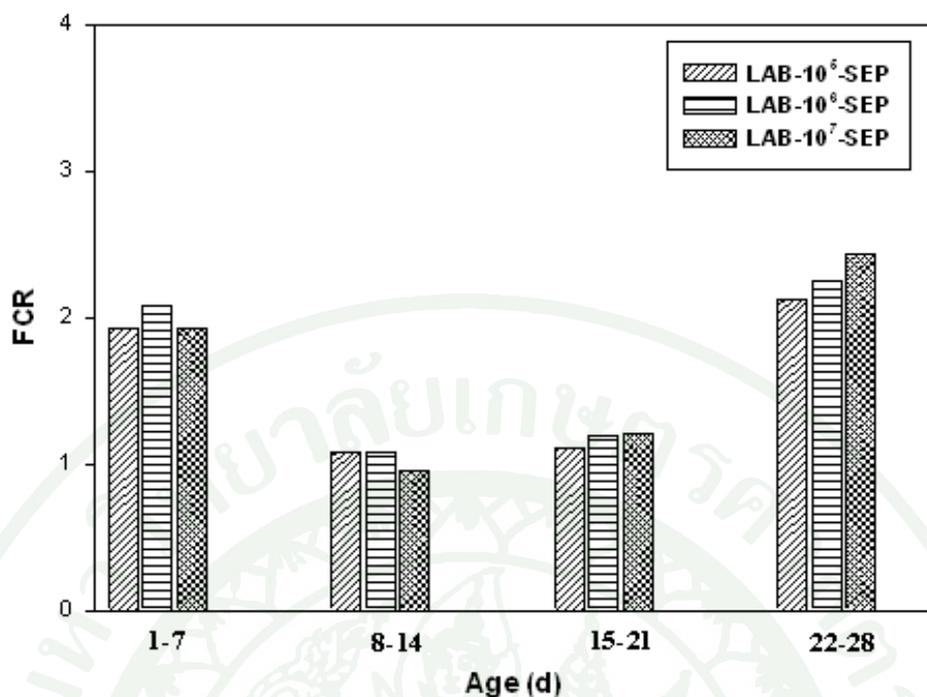
ผลการเลี้ยงไก่แบบกลุ่ม SEP ที่ปริมาณการให้เชื้อ 10⁵ 10⁶ และ 10⁷ CFUต่อกรัม พบว่าปริมาณการกินอาหารในช่วงอายุ 1-7 8-14 และ 15-21 วัน มีค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในภาพที่ 22 มีปริมาณการกินอาหารเป็น 0.18-0.2 0.21-0.22 และ 0.38-0.39 กิโลกรัม ตามลำดับ แต่ในช่วงอายุ 22-28 วัน กลุ่ม LAB-10⁷-SEP มีปริมาณการกินอาหารได้มากที่สุด คือ 1.189 กิโลกรัม รองลงมาคือ กลุ่ม LAB-10⁶-SEP และกลุ่ม LAB-10⁵-SEP มีค่าเป็น 1.049 และ 1.032 กิโลกรัม ตามลำดับ และจากผลการกินอาหารพบว่ามึ้นน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในช่วงอายุ 1-7 วัน มีค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในภาพที่ 23 สำหรับในช่วงอายุ 8-14 วัน และ 22-28 วัน พบว่ากลุ่ม LAB-10⁷-SEP มีน้ำหนักตัวเพิ่มมากกว่ากลุ่มอื่น รองลงมาคือ กลุ่ม LAB-10⁵-SEP และ LAB-10⁶-SEP ตามลำดับ เมื่อพิจารณาตลอดช่วงอายุ 1-28 วัน พบว่า LAB-10⁵-SEP LAB-10⁶-SEP และ LAB-10⁷-SEP มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นเป็น 1.136 1.079 และ 1.108 กิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งจากผลการเจริญเติบโตทั้งหมดพบว่ากลุ่ม LAB-10⁷-SEP มีค่าการกินอาหารได้ดีที่สุด และกลุ่ม LAB-10⁵-SEP มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นได้ดีที่สุด และจากการผลของอัตราการเปลี่ยนอาหาร ดังแสดงในภาพที่ 24 ในช่วงอายุ 22-28 วัน และผลการประเมินตลอดช่วงอายุ 1-28 วัน ดังแสดงในตารางที่ 12 พบว่ากลุ่ม LAB-10⁷-SEP มีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารสูงสุดแสดงว่ามีการกินอาหารได้มากแต่มีค่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นได้น้อยซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารที่ต่ำ สำหรับกลุ่มที่มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นและมีประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารได้ดีที่สุด คือ กลุ่ม LAB-10⁵-SEP



ภาพที่ 22 ปริมาณอาหารที่กิน (Feed intake) ของไก่กลุ่ม SEP



ภาพที่ 23 น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (BW gain) ของไก่กลุ่ม SEP

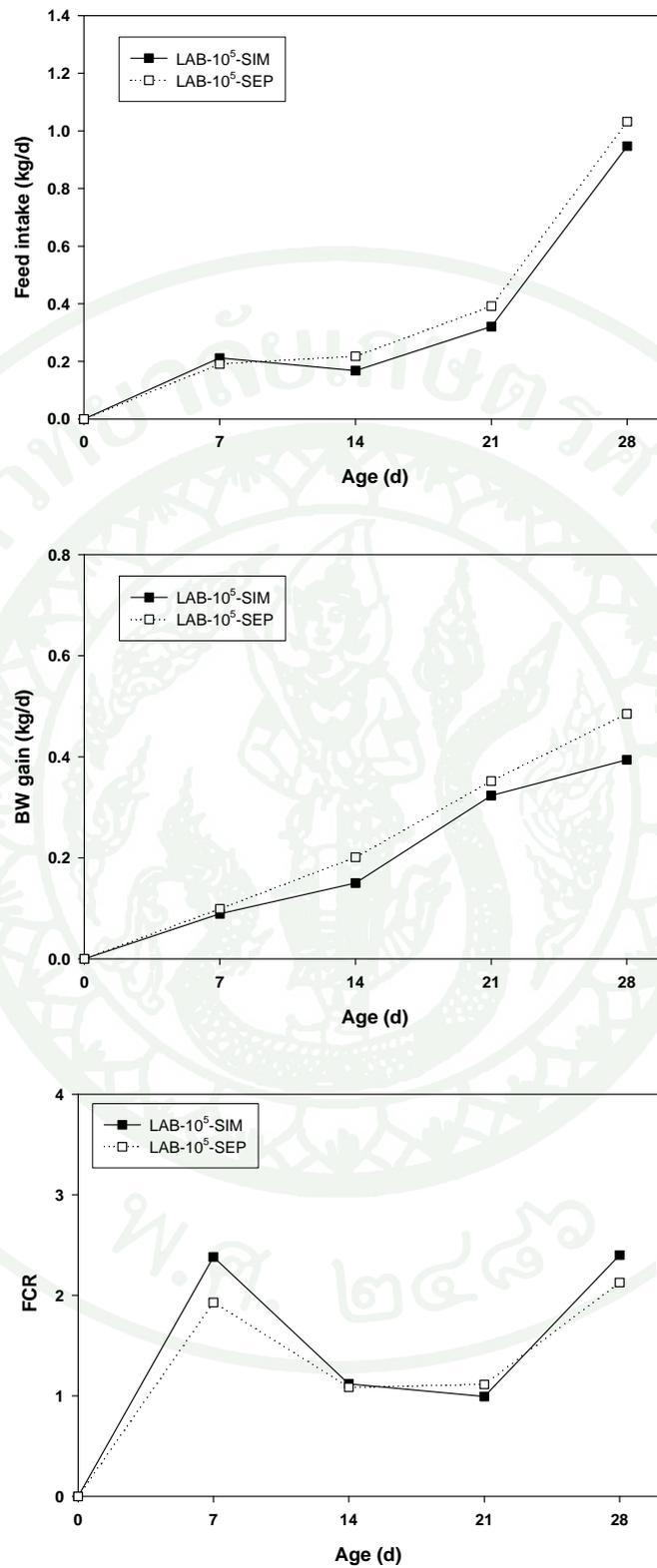


ภาพที่ 24 อัตราการเปลี่ยนอาหาร (FCR) ของไก่กลุ่ม SEP

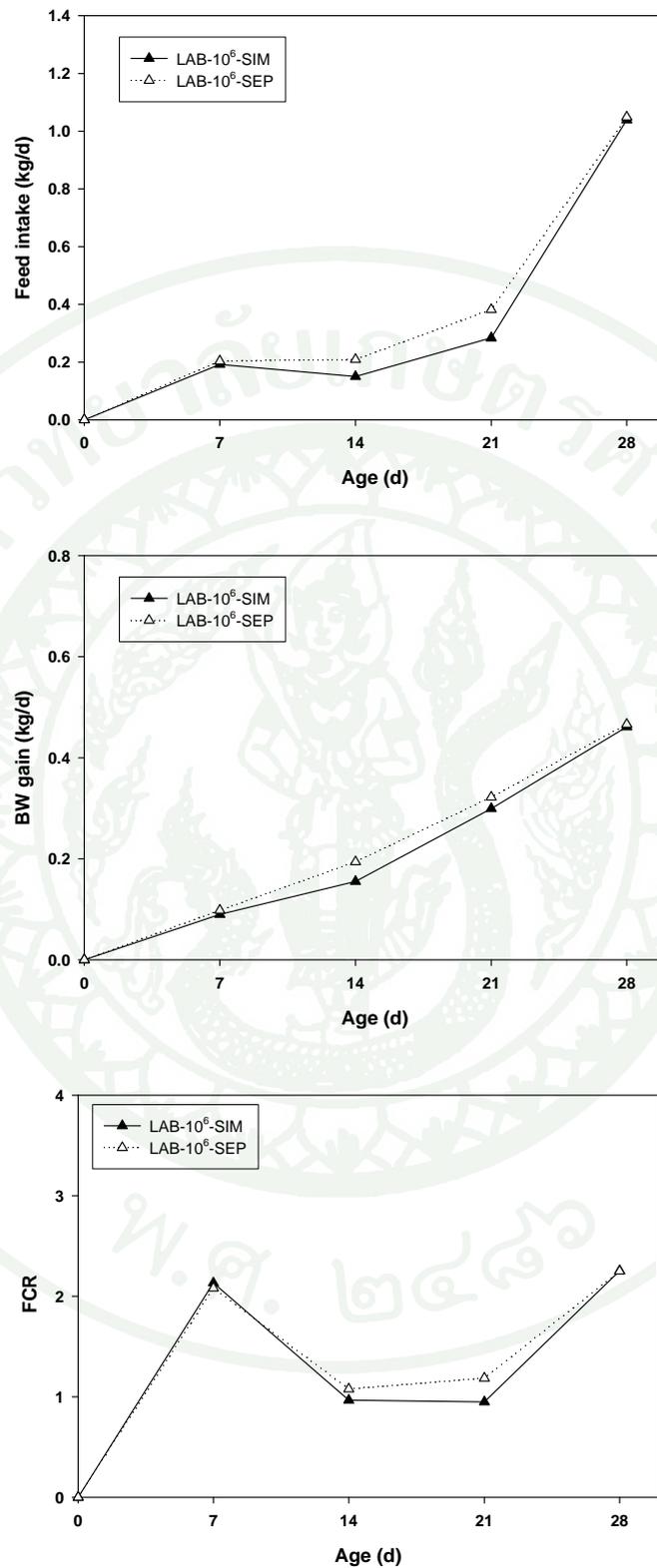
การศึกษาผลของการให้ *Salmonella Enteritidis* S003 ใน 2 สภาวะ คือ ในไก่อายุ 1 วัน และไก่อายุ 3 วัน พบว่าทั้งกลุ่ม SIM และกลุ่ม SEP ที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10^5 10^6 และ 10^7 CFU ต่อกรัม มีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะที่สอดคล้องกันตลอดช่วงอายุ 1-28 วัน จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่า การให้โปรไบโอติกแบบกลุ่ม SEP มีการกินอาหารได้มากกว่ากลุ่ม SIM ในช่วงอายุ 8-14 15-21 และ 22-28 วัน โดยพบว่า LAB-10⁷-SEP มีการกินอาหารได้มากที่สุด คือ 1.946 กิโลกรัม รองลงมาคือ LAB-10⁶-SEP 1.843 กิโลกรัม และ LAB-10⁵-SEP 1.801 ดังแสดงในตารางที่ 12 และพบว่ากลุ่ม SEP มีค่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่ม SIM ตลอดช่วงอายุ 1-28 วัน โดยพบว่ากลุ่ม LAB-10⁵-SEP มีค่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นสูงที่สุด คือ 1.136 กิโลกรัม รองลงมาคือ กลุ่ม LAB-10⁷-SEP 1.108 กิโลกรัม และ LAB-10⁶-SEP 1.079 กิโลกรัม สำหรับค่าอัตราการเปลี่ยนอาหาร พบว่ากลุ่ม SEP มีแนวโน้มที่ดีกว่ากลุ่ม SIM ในช่วงอายุ 1-7 วัน 8-14 วัน และ 22-28 วัน ซึ่งจากผลการเจริญเติบโตทั้งหมดในช่วงอายุ 1-28 วัน พบว่ากลุ่ม SEP มีปริมาณการกินอาหารและน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นที่ดีกว่ากลุ่ม SIM แสดงว่าภายใต้สภาวะจำลองการติดเชื้อ *Salmonella Enteritidis* S003 หลังการให้โปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 เป็นเวลา 2 วัน มีแนวโน้มที่สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของไก่ได้ดีกว่าสภาวะจำลองการติดเชื้อ *Salmonella Enteritidis* S003 พร้อมกับการให้ โปรไบโอติก *Lactobacillus*

reuteri KUB-AC5 และจากผลการทดลองนี้พบว่าในสภาวะจำลองทั้ง SIM และ SEP ที่ระดับ ปริมาณเชื้อ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10^5 10^6 และ 10^7 CFU ต่อกรัม พบว่ามีผลการ เจริญเติบโตได้ไม่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงในภาพที่ 25-27

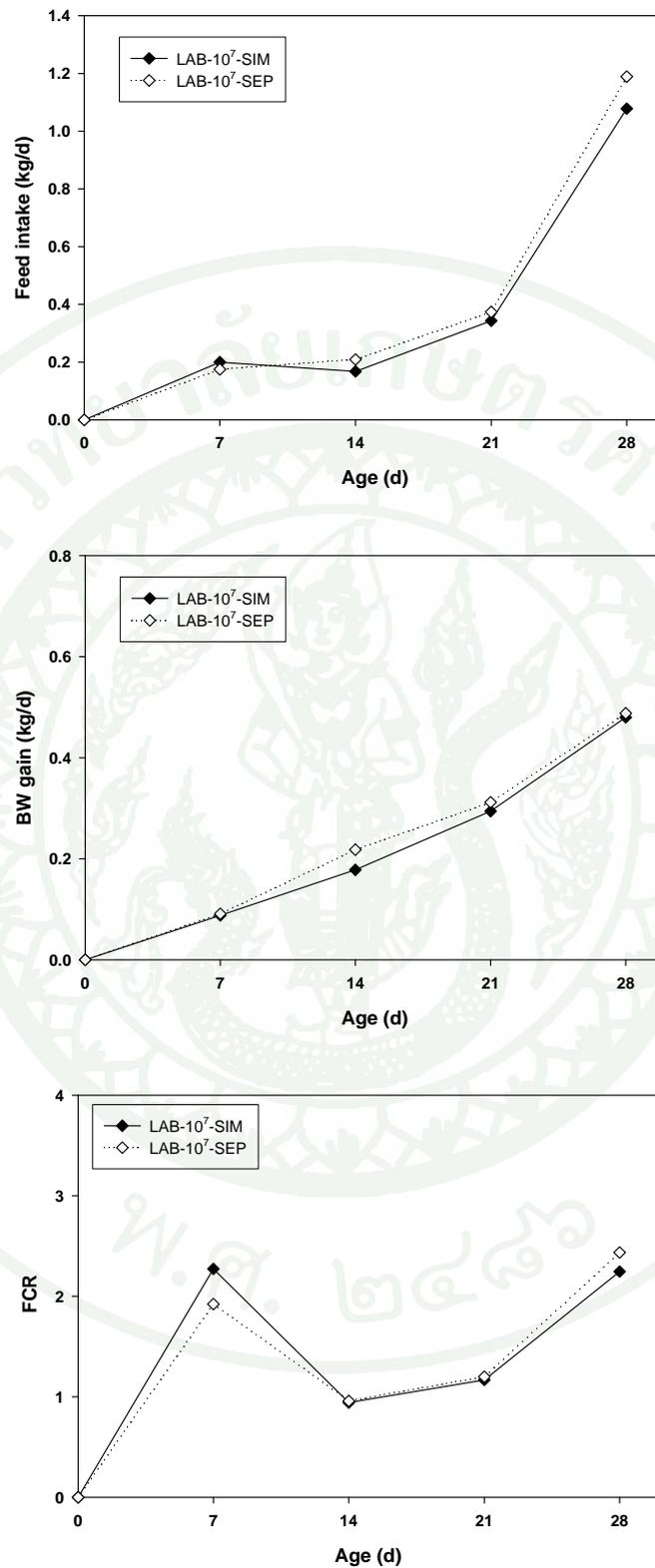




ภาพที่ 25 ผลการเจริญเติบโตของไก่กลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10⁵ CFUต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella Enteritidis* S003 แบบ SIM และ SEP



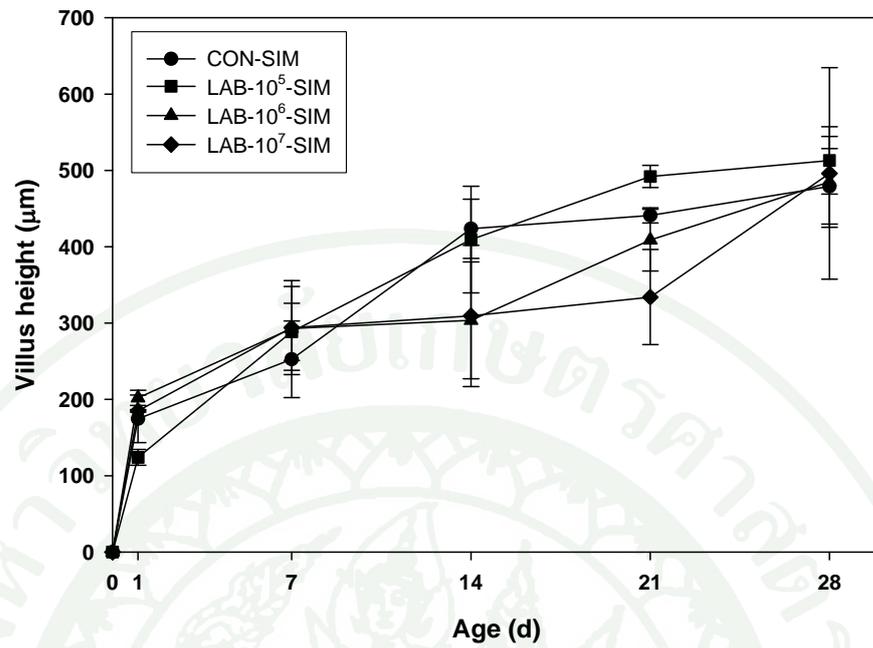
ภาพที่ 26 ผลการเจริญเติบโตของไก่กลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10⁶ CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella Enteritidis* S003 แบบ SIM และ SEP



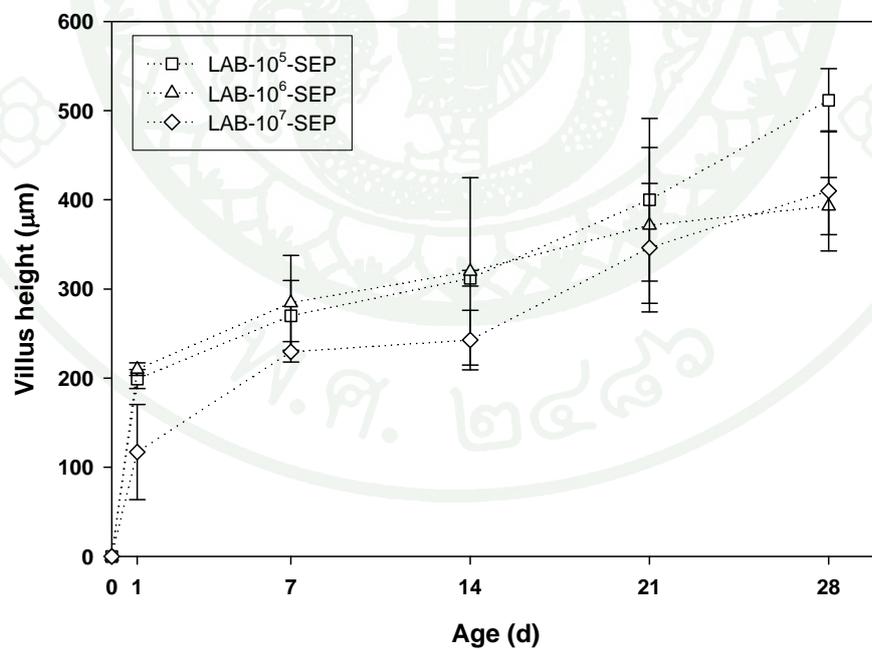
ภาพที่ 27 ผลการเจริญเติบโตของไก่กลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10^7 CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella Enteritidis* S003 แบบ SIM และ SEP

2.2 ผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 ต่อความสูงของวิลลัสในลำไส้เล็กส่วนเจริญนมของไก่เนื้อ

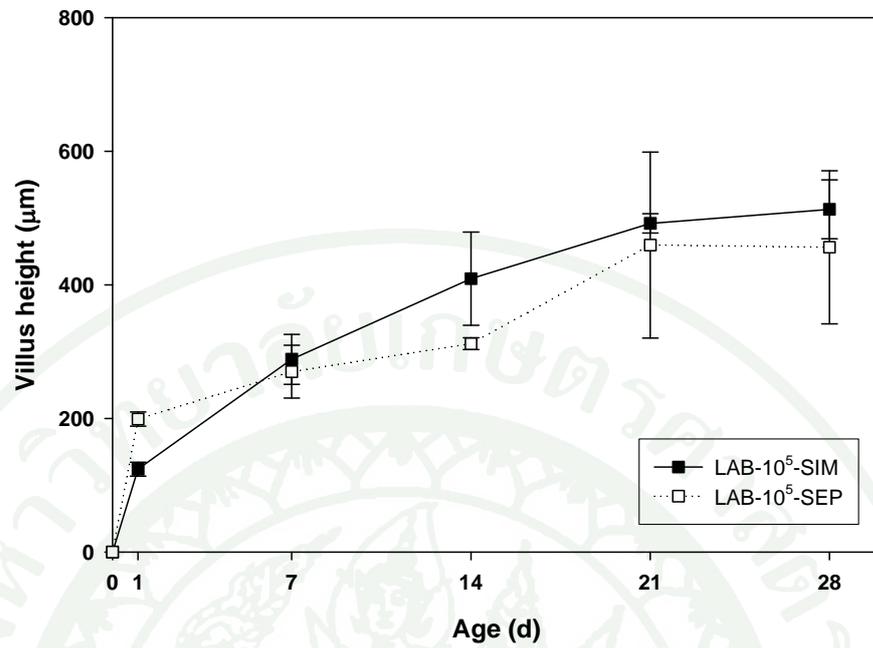
ในไก่กลุ่ม SIM พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงความสูงของวิลลัสที่มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นตามอายุของไก่ แต่มีพัฒนาการที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มและช่วงอายุของไก่ ดังแสดงในภาพที่ 28 จากผลความสูงของวิลลัสที่อายุ 28 วัน พบว่ากลุ่มที่ให้โปรไบโอติกทุกกลุ่มมีความสูงของวิลลัสมากกว่ากลุ่มควบคุม โดยกลุ่มที่มีความสูงของวิลลัสมากที่สุด คือ LAB-10⁵-SIM 513 ± 44.06 ไมครอน และกลุ่มที่มีระดับความสูงรองลงมา ได้แก่ LAB-10⁷-SIM 496 ± 138.59 ไมครอน และ LAB-10⁶-SIM 485±59.57 ไมครอน สำหรับในไก่กลุ่ม SEP พบว่ามีพัฒนาการดังแสดงในภาพที่ 29 พบว่าไก่ที่อายุ 28 วัน กลุ่มที่มีความสูงของวิลลัสมากที่สุด คือ LAB-10⁵-SEP 511.67 ±35.47 ไมครอน รองลงมา คือ กลุ่ม LAB-10⁷-SEP 410 ± 67.37 ไมครอน และกลุ่ม LAB-10⁶-SEP 393 ± 32.10 ไมครอน จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่าไก่กลุ่มที่ให้โปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10⁵ CFU ต่อกรัม สามารถส่งเสริมการพัฒนาความสูงของวิลลัสในลำไส้เล็กส่วนเจริญนมได้ดีที่สุด โดยที่ระดับปริมาณการให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ระดับเดียวกันพบว่าไก่กลุ่ม SIM มีแนวโน้มของความสูงที่มากกว่ากลุ่ม SEP ดังแสดงในภาพที่ 30-32 แสดงว่าไก่กลุ่มที่ให้โปรไบโอติกและสภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 พร้อมกัน (SIM) มีแนวโน้มของการพัฒนาความสูงของวิลลัสได้สูงกว่าสภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 หลังจากการให้โปรไบโอติก 2 วัน



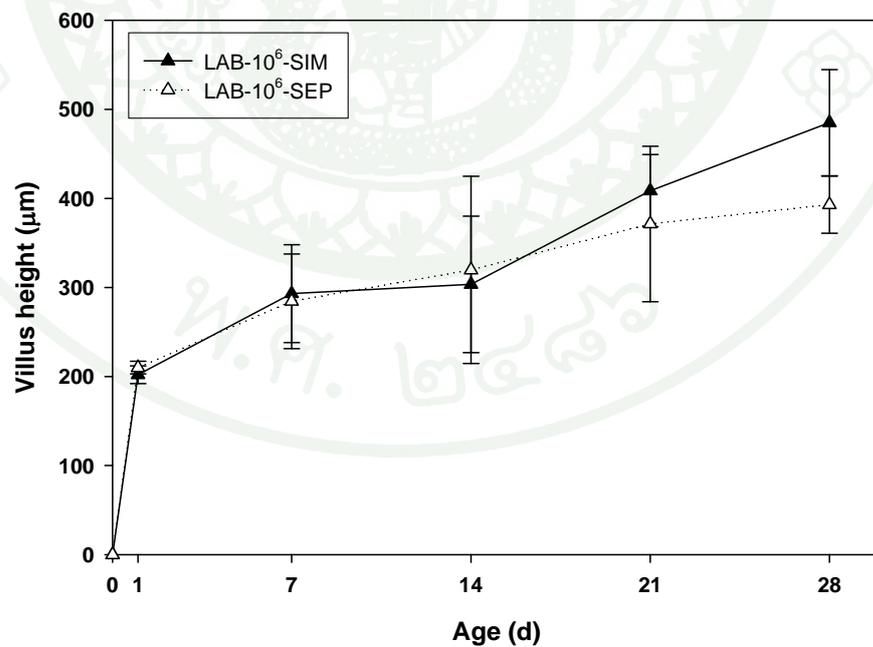
ภาพที่ 28 ความสูงของวิลลัสในไก่กลุ่ม SIM



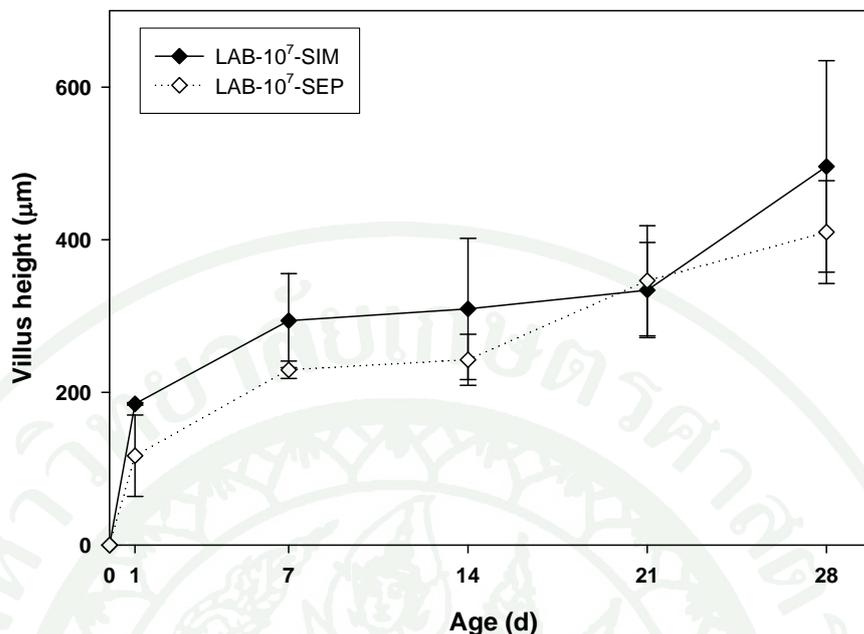
ภาพที่ 29 ความสูงของวิลลัสในไก่กลุ่ม SEP



ภาพที่ 30 ความสูงของวิลลัสในไก่อกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10^5 CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP



ภาพที่ 31 ความสูงของวิลลัสในไก่อกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10^6 CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP



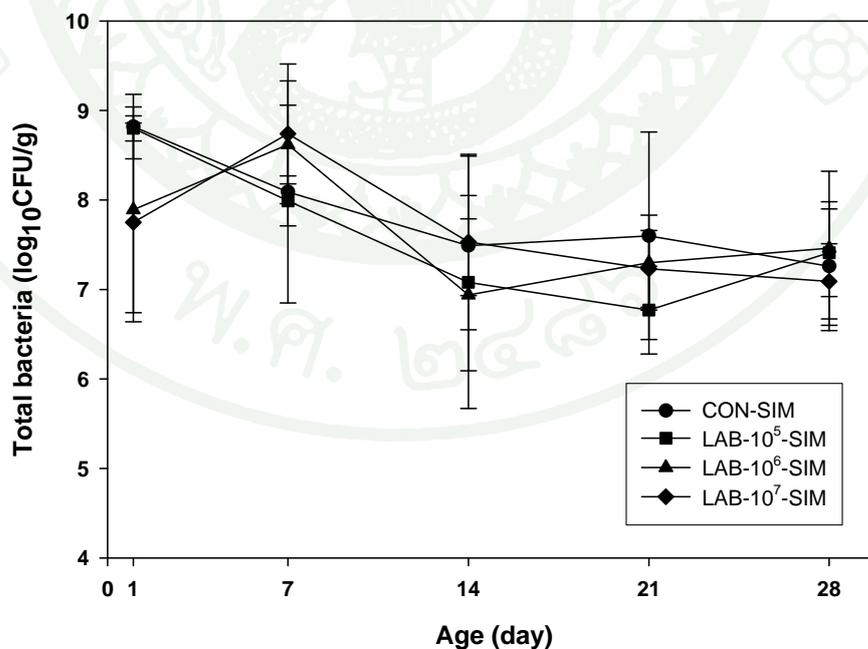
ภาพที่ 32 ความสูงของวิลลัสในไก่อกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10^7 CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP

2.3 ผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 ต่อปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมของไก่เนื้อ

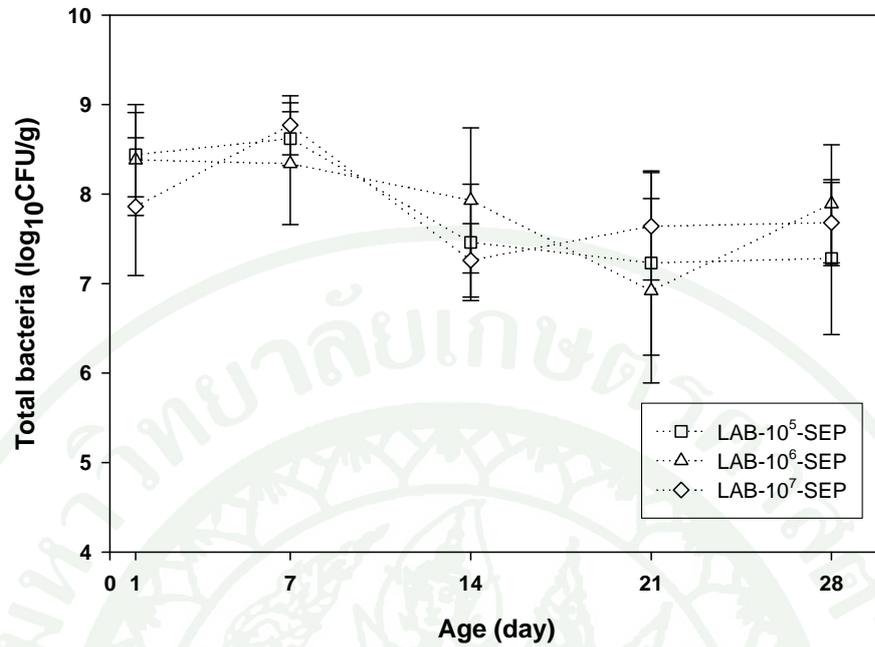
2.3.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในลำไส้ส่วนเจจูนัม

ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมบนอาหารแข็ง BHI ในไก่อกลุ่ม SIM พบว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณจุลินทรีย์ได้ตลอดทุกช่วงอายุ ดังแสดงในภาพที่ 33 พบว่าที่อายุ 7 วัน ทุกกลุ่มมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดประมาณ $8-8.77 \log_{10}$ CFU ต่อกรัม หลังจากนั้นเมื่ออายุ 14 วัน มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลงเหลือประมาณ $7-7.5 \log_{10}$ CFU ต่อกรัม และในช่วงอายุ 14-21 วัน พบว่ากลุ่ม CON-SIM และ LAB-10⁶-SIM มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น แต่กลุ่ม LAB-10⁵-SIM และ LAB-10⁶-SIM มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลง และในช่วงอายุ 21-28 วัน พบว่ากลุ่ม LAB-10⁵-SIM และ LAB-10⁶-SIM มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น แต่กลุ่ม CON-SIM และ LAB-10⁷-SIM มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลง สำหรับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในลำไส้ไก่ส่วนเจจูนัมที่อายุ 28 วัน พบว่ากลุ่มที่มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดมากที่สุด คือ กลุ่ม LAB-10⁶-SIM $7.46 \pm 0.86 \log_{10}$

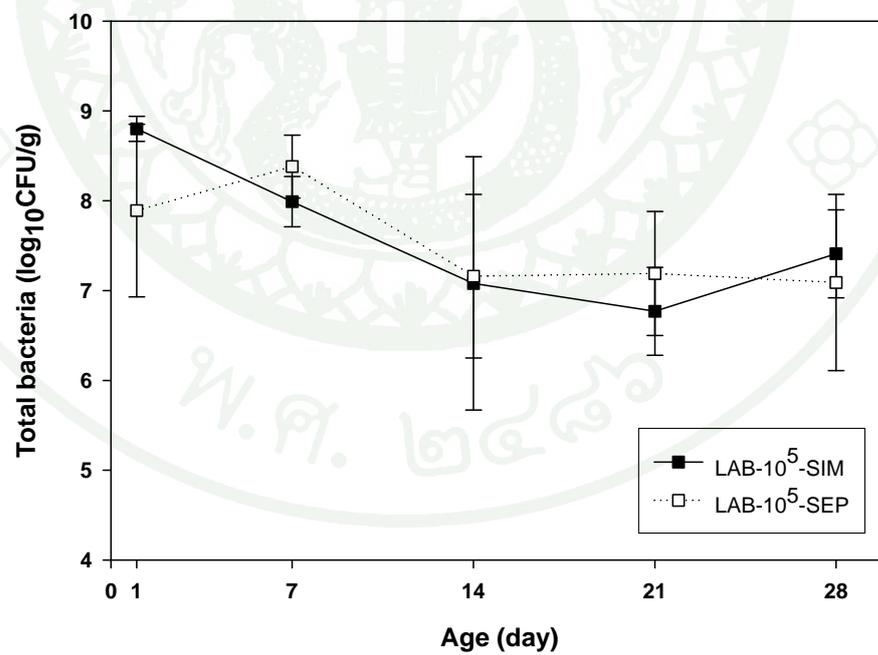
CFU ต่อกรัม รองลงมาคือ กลุ่ม LAB-10⁵-SIM 7.41±0.49 กลุ่ม CON-SIM 7.26 ± 0.86 log₁₀ CFU ต่อกรัม และ LAB-10⁷-SIM 7.09 ± 0.42 log₁₀ CFU ต่อกรัม แสดงว่าการให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10⁵ และ 10⁶ CFU ต่อกรัม ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดในไก่กลุ่ม SIM สำหรับในการทดลองของไก่กลุ่ม SEP ดังแสดงในภาพที่ 34 พบว่าไก่ทุกกลุ่มในช่วงอายุ 1-7 วัน มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น และลดลงในช่วง 7-14 วัน และที่อายุ 21 วัน พบว่ากลุ่ม LAB-10⁷-SEP มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมากที่สุด รองลงมา คือ กลุ่ม LAB-10⁵-SEP และ LAB-10⁶-SEP ตามลำดับ สำหรับที่อายุ 28 วัน พบว่าไก่กลุ่ม LAB-10⁶-SEP มีปริมาณจุลินทรีย์มากที่สุด รองลงมา คือ กลุ่ม LAB-10⁷-SEP และ LAB-10⁵-SEP ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าทุกกลุ่มมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงอายุที่แตกต่างกัน และมีแนวโน้มในทิศทางที่เพิ่มขึ้นและลดลงได้ตลอดเวลา และพบว่าไก่ที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10⁶ CFU ต่อกรัม มีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดมากที่สุดในทุกทั้งแบบ SIM และ SEP สำหรับการพิจารณาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ระดับการให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ปริมาณเท่ากัน ดังแสดงในภาพที่ 35-37 พบว่าภายใต้สภาวะการปนเปื้อน *Salmonella Enteritidis* S003 แบบ SEP มีแนวโน้มของการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดได้สูงกว่าสภาวะการปนเปื้อนแบบ SIM



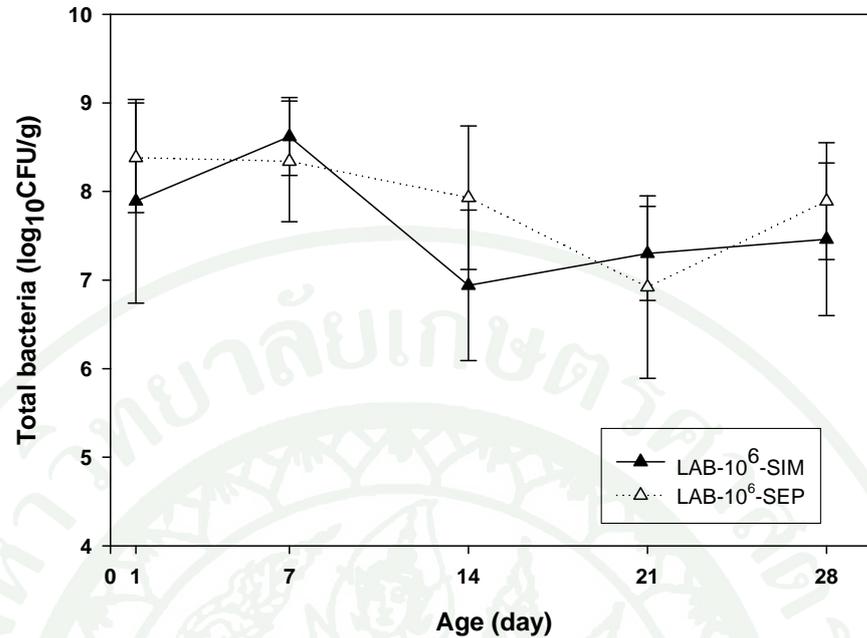
ภาพที่ 33 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในไก่กลุ่ม SIM



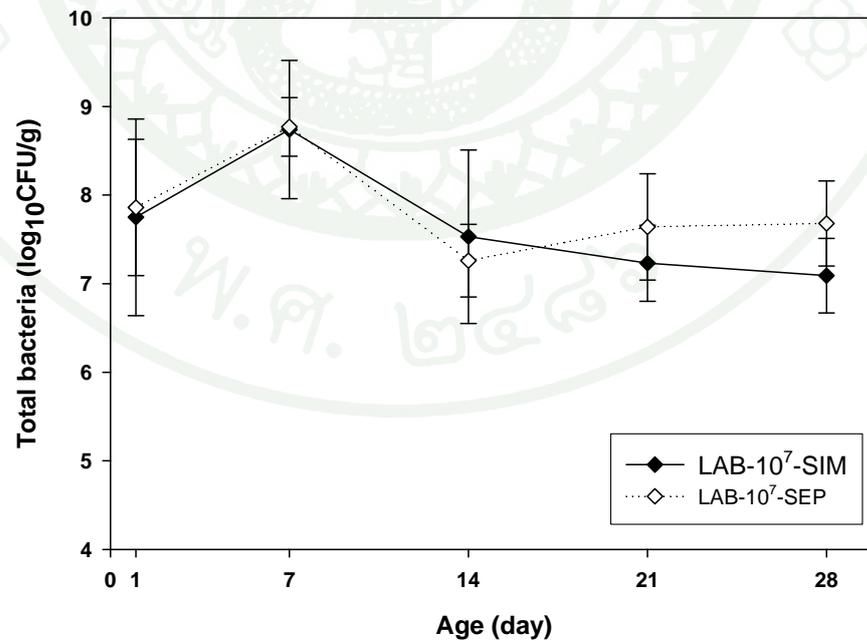
ภาพที่ 34 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในไก่กลุ่ม SEP



ภาพที่ 35 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในไก่กลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10⁵ CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP



ภาพที่ 36 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในไก่กลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10⁶ CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP

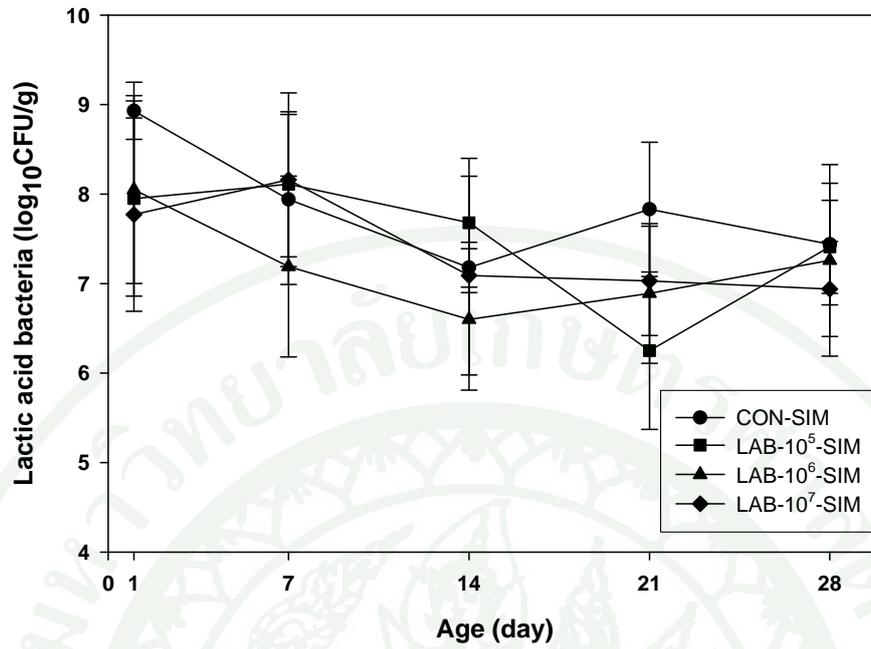


ภาพที่ 37 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในไก่กลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10⁷ CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP

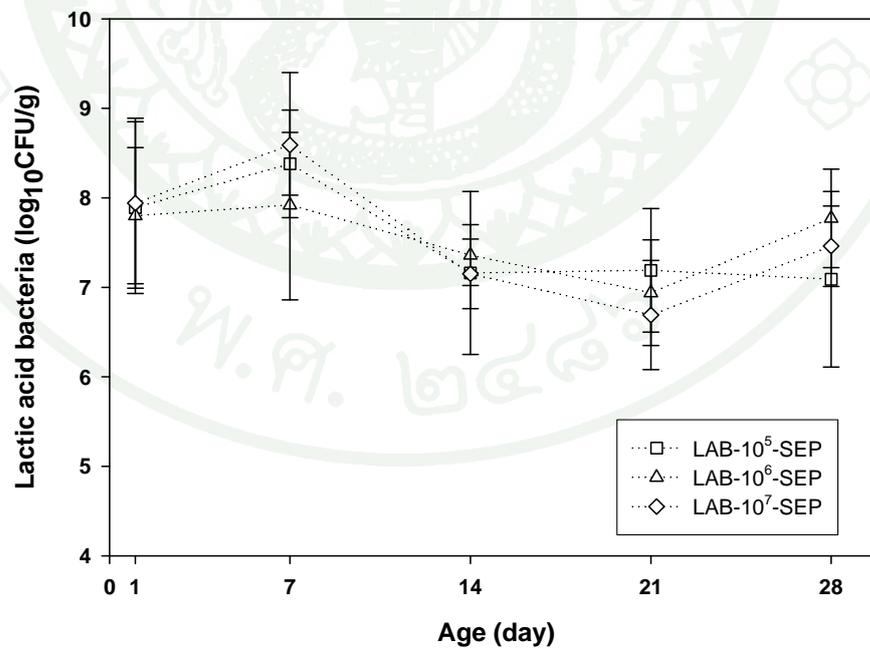
2.3.2 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกในลำไส้ส่วนเจริญ

ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในลำไส้เล็ก ส่วนเจริญของไก่อกลุ่ม SIM บนอาหารแข็ง MRS ดังแสดงในภาพที่ 38 พบว่าในช่วงอายุ 1-7 วัน ไก่อกลุ่ม CON-SIM และ LAB-10⁶-SIM มีปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกลดลง แต่กลุ่ม LAB-10⁵-SIM และ LAB-10⁷-SIM มีปริมาณจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น ในช่วงอายุ 7-14 วัน มีปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกลดลงทุกกลุ่ม ในช่วงอายุ 14-21 วัน กลุ่ม CON-SIM และ LAB-10⁶-SIM มีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่กลุ่ม LAB-10⁵-SIM และ LAB-10⁷-SIM มีปริมาณลดลง สำหรับในช่วงอายุ 21-28 วัน พบว่ากลุ่ม LAB-10⁵-SIM และ LAB-10⁶-SIM มีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่กลุ่ม CON-SIM และ LAB-10⁷-SIM มีปริมาณลดลง โดยที่อายุ 28 วัน พบว่าไก่อกลุ่ม CON-SIM มีปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกมากที่สุด กลุ่มที่รองลงมา ได้แก่ LAB-10⁵-SIM LAB-10⁶-SIM และ LAB-10⁷-SIM จากผลการทดลองแสดงว่า *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ไม่มีผลในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกในไก่อกลุ่ม SIM สำหรับไก่อกลุ่ม SEP มีปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก ดังแสดงในภาพที่ 39 พบว่าในช่วงอายุ 1-14 วัน ไก่อทุกกลุ่มมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงที่สอดคล้องกันตลอด แต่เมื่ออายุ 14-28 วัน พบว่ากลุ่ม LAB-10⁵-SEP มีปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกค่อนข้างจะคงที่ แต่กลุ่ม LAB-10⁶-SEP และ LAB-10⁷-SEP ยังคงมีการเปลี่ยนแปลง โดยมีปริมาณลดลงเมื่ออายุ 21 วัน และเพิ่มขึ้นเมื่ออายุ 28 วัน โดยที่อายุ 28 วัน พบว่ากลุ่ม LAB-10⁶-SEP มีปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกมากที่สุด รองลงมา คือ LAB-10⁷-SEP และ LAB-10⁵-SEP ตามลำดับ สำหรับการพิจารณาปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกที่ระดับการให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ปริมาณเท่ากัน ดังแสดงในภาพที่ 40-42 พบว่าการให้แบบกลุ่ม SEP มีแนวโน้มของการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกได้ดีกว่าการให้แบบ SIM

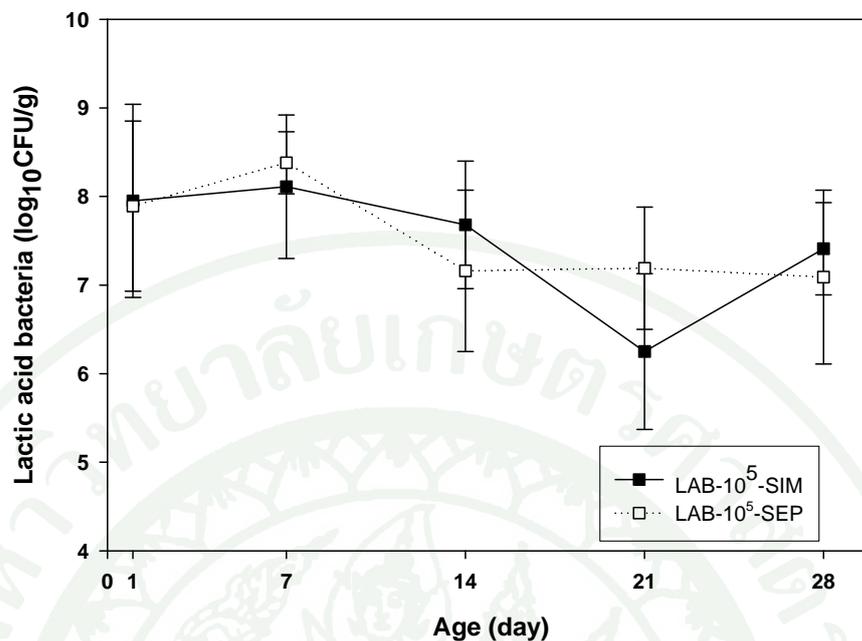
จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่ากลุ่ม SEP มีปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียกรดแลกติกมากกว่ากลุ่ม SIM แสดงว่าภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 ในระยะเริ่มต้น ส่งผลให้มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียกรดแลกติกลดลง และภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 ภายหลังจากได้รับโปรไบโอติก 2 วัน มีแนวโน้มที่มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียกรดแลกติกมากกว่า



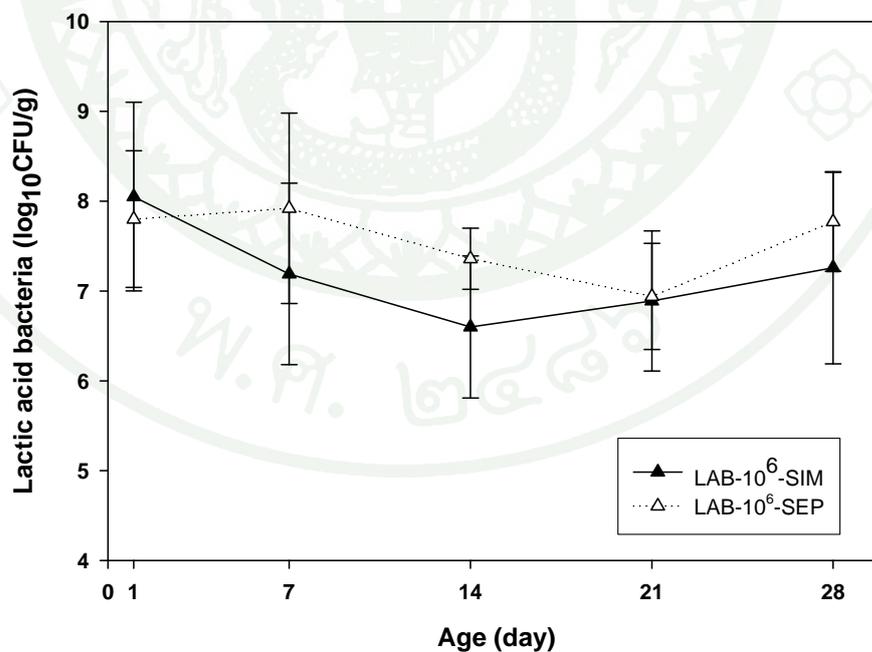
ภาพที่ 38 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในไก่กลุ่ม SIM



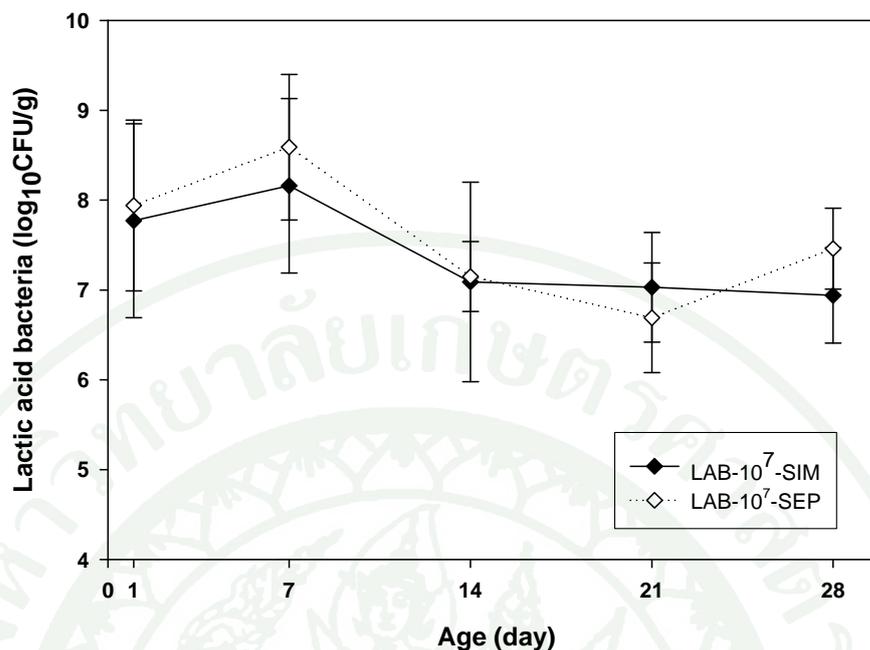
ภาพที่ 39 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในไก่กลุ่ม SEP



ภาพที่ 40 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในไก่กลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10⁵ CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP



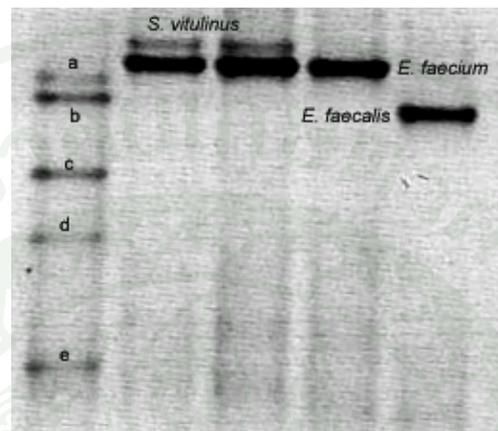
ภาพที่ 41 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในไก่กลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10⁶ CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP



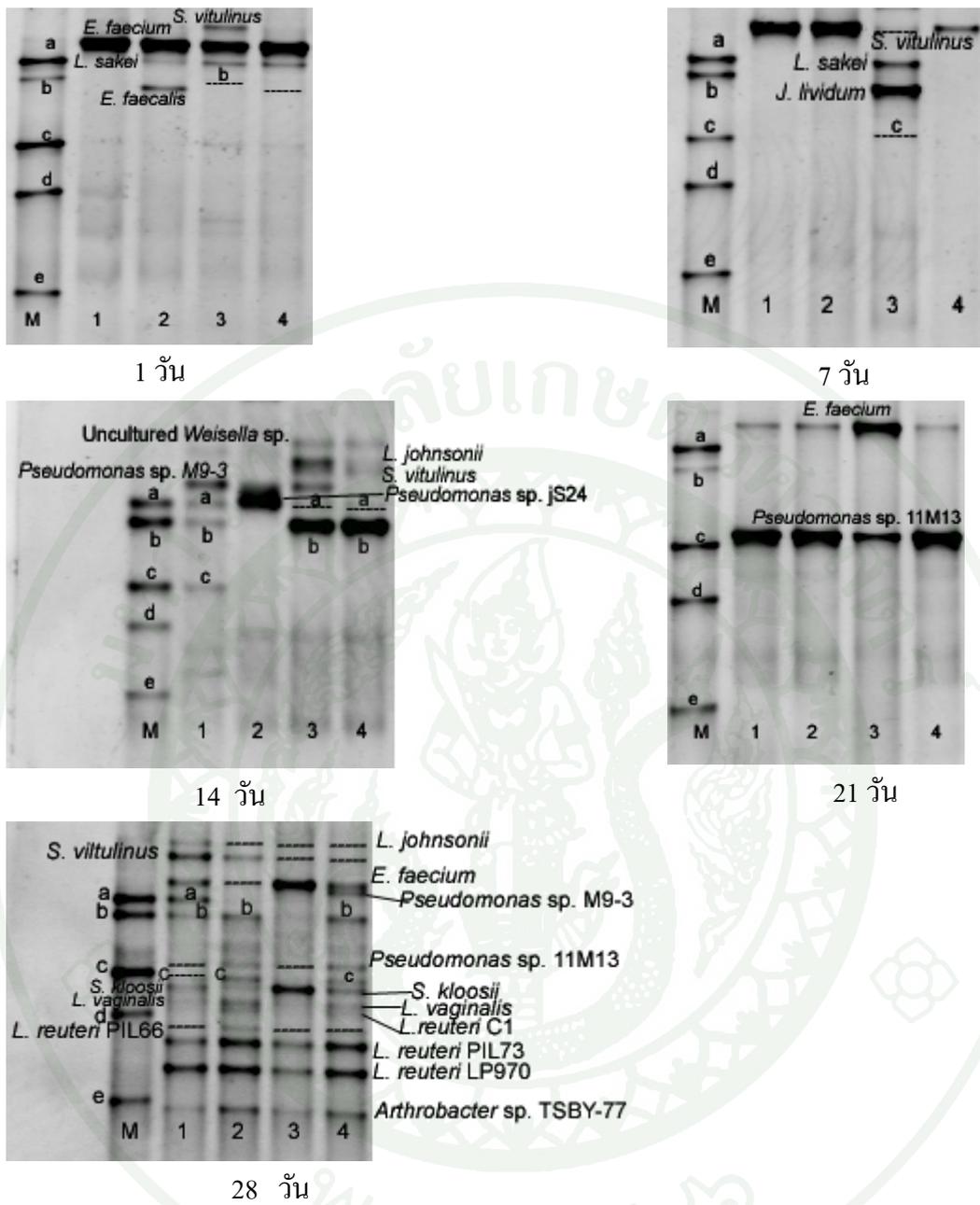
ภาพที่ 42 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในไก่กลุ่มที่ให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10^7 CFU ต่อกรัม ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 แบบ SIM และ SEP

2.4 ผลของโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 ต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดของจุลินทรีย์ในลำไส้เล็ก ส่วนเจนนัมของไก่เนื้อ โดยวิธี PCR-DGGE

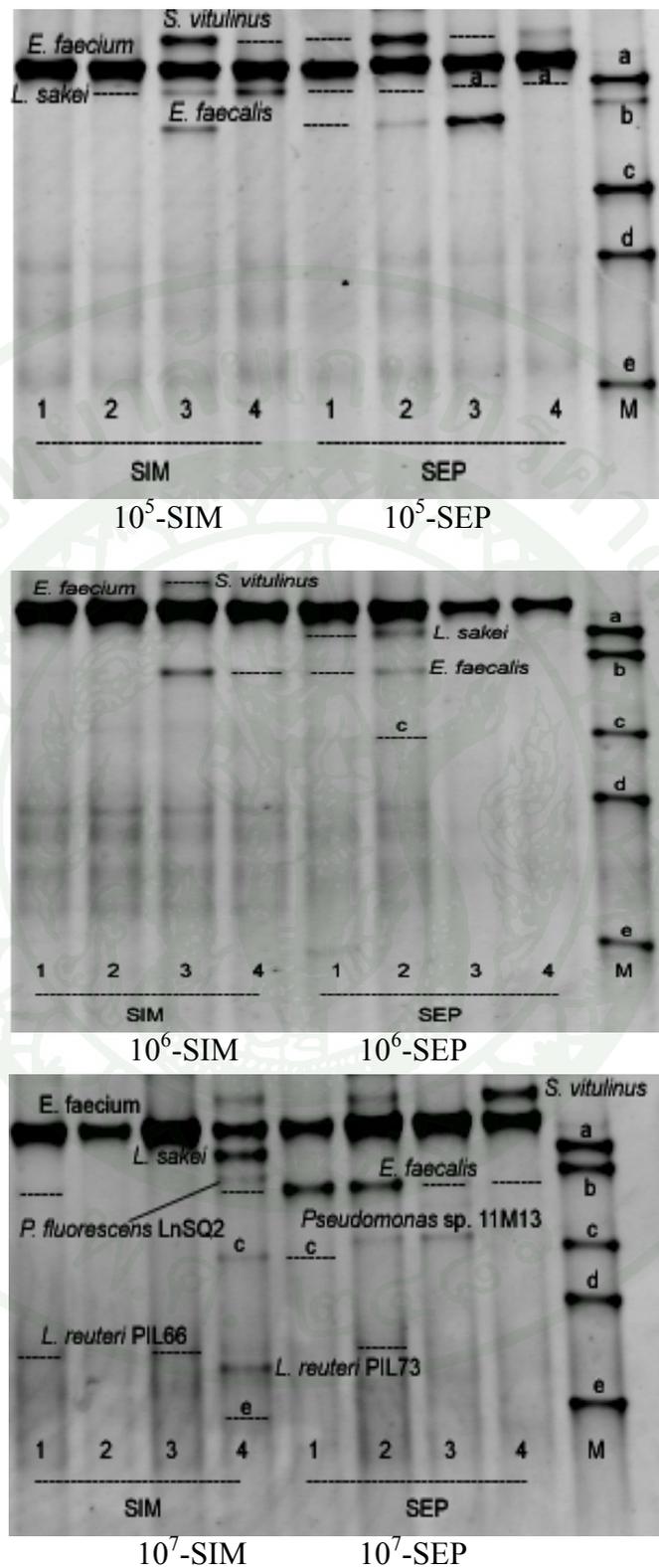
เมื่อเริ่มการทดลองเก็บตัวอย่างลูกไก่ที่เพิ่งจะฟักและยังไม่ได้กินอาหารจำนวน 4 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์ด้วย PCR-DGGE พบเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ *Staphylococcus vitulinus* *Enterococcus faecium* และ *Enterococcus faecalis* ดังแสดงในภาพที่ 43 ซึ่งเชื่อที่พบน่าจะได้รับการมาจากแม่ไก่และสิ่งแวดล้อมในการฟัก เช่น ในตู้บ่ม และเมื่อจัดไก่เข้าคอกเรียบร้อยแล้วจึงให้อาหารเป็นข้าวโพดป่นและให้น้ำดื่ม หลังจากนั้น 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างในไก่ที่สุ่มแบ่งกลุ่มแล้วได้แก่ CON-SIM LAB-10⁵-SIM LAB-10⁶-SIM LAB-10⁷-SIM LAB-10⁵-SEP LAB-10⁶-SEP และ LAB-10⁷-SEP กลุ่มละ 4 ตัว พบการเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus sakei* *Lactobacillus salivarius* *Lactobacillus reuteri* สายพันธุ์ KUB-AC5 PIL66 และ PIL73 *Pseudomonas fluorescens* strain *Pseudomonas* sp. และ *Salmonella* Enteritidis ดังแสดงในภาพที่ 44-45 ซึ่งจากการที่พบความหลากหลายของเชื้อเพิ่ม



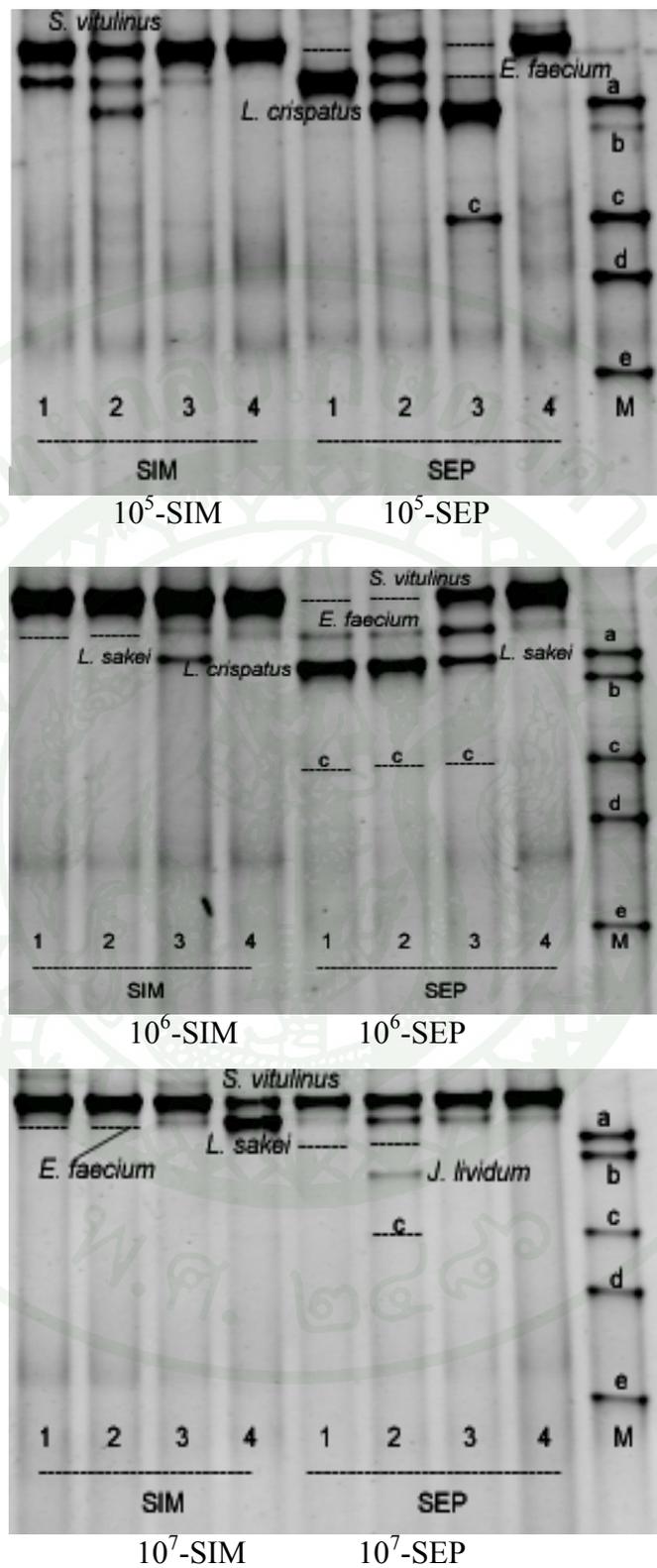
ภาพที่ 43 PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่หลังจากฟักและก่อนการได้รับอาหาร



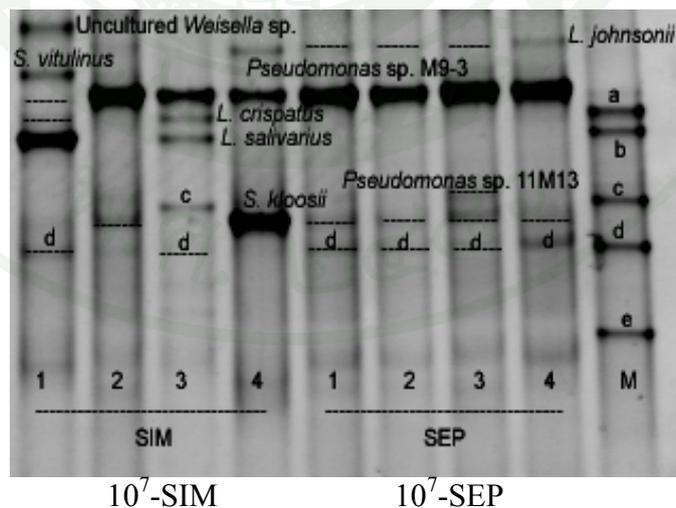
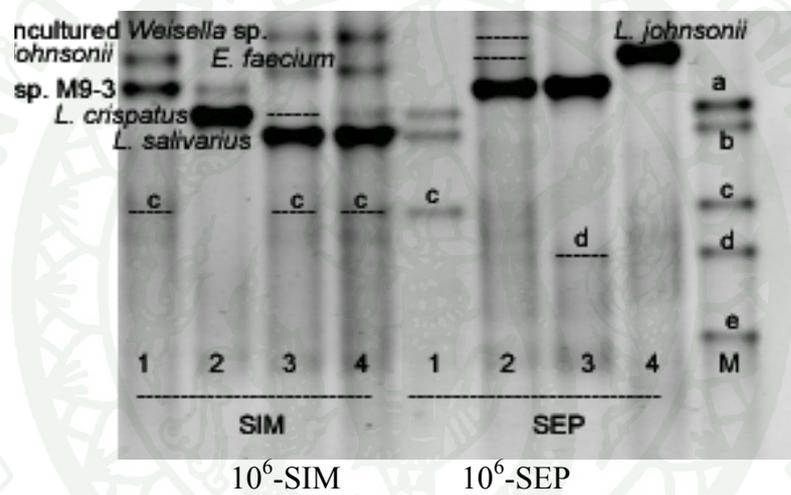
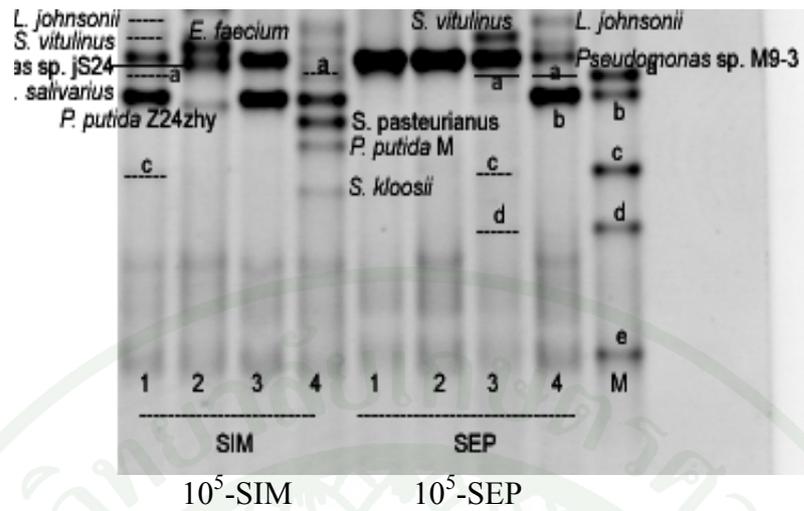
ภาพที่ 44 PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม (CON-SIM) โดยใช้เชื้อเปรียบเทียบ ได้แก่ a : *L. acidophilus* b : *L. salivarius* KUB-AC21 c : *L. reuteri* KUB-AC5 d : *E. coli* E010 และ e : *S. Enteritidis* S003



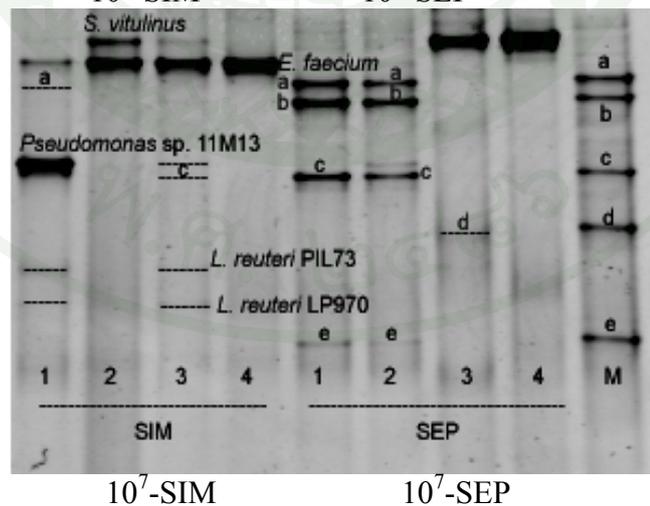
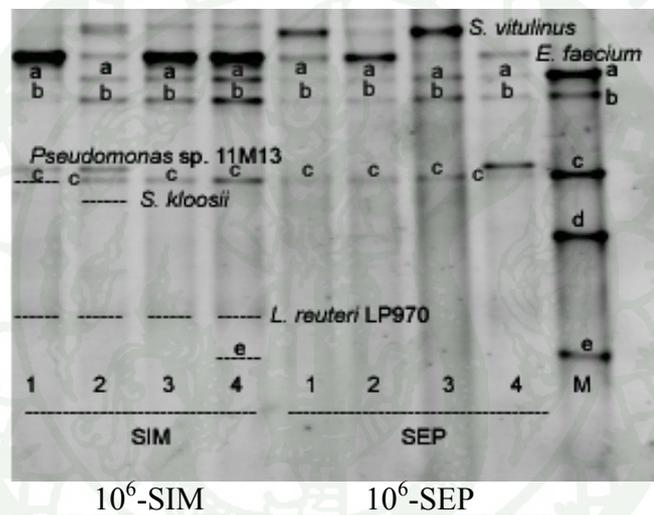
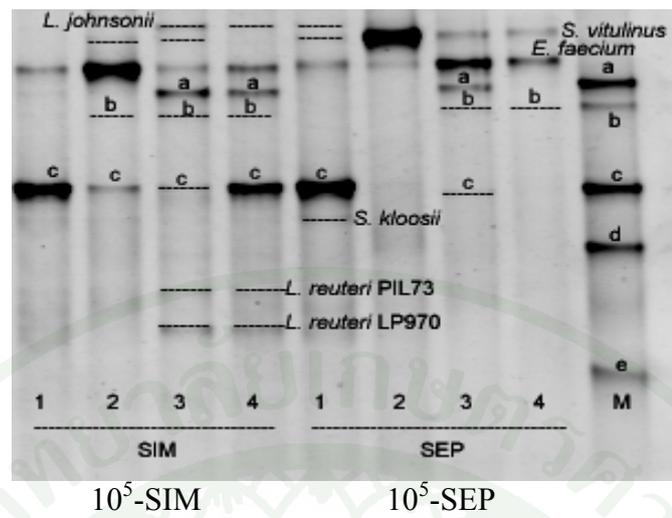
ภาพที่ 45 PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม SIM และ SEP อายุ 1 วัน โดยใช้เชื้อเปรียบเทียบ ได้แก่ a : *L. acidophilus* b : *L. salivarius* KUB-AC21 c : *L. reuteri* KUB-AC5 d : *E. coli* E010 และ e : *S. Enteritidis* S003



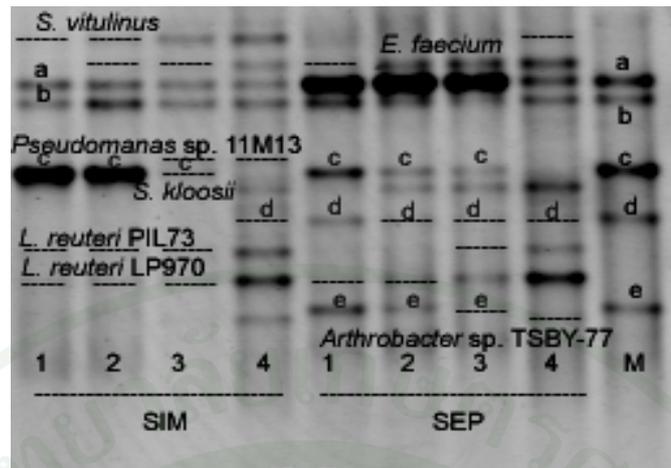
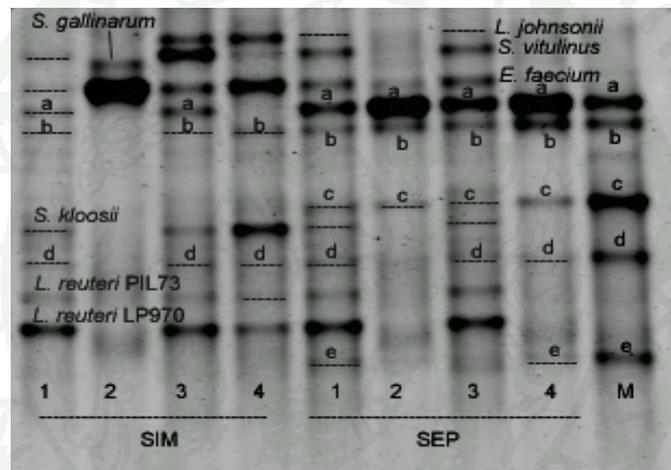
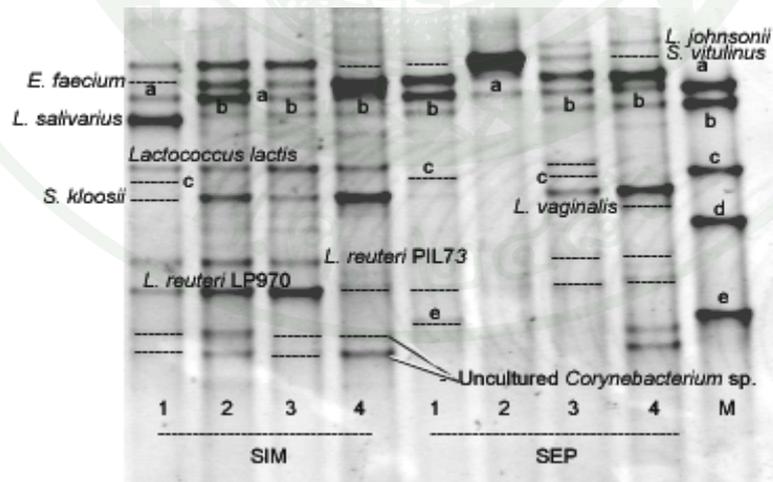
ภาพที่ 46 PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม SIM และ SEP อายุ 7 วัน โดยใช้เชื้อเปรียบเทียบ ได้แก่ a : *L. acidophilus* b : *L. salivarius* KUB-AC21 c : *L. reuteri* KUB-AC5 d : *E. coli* E010 และ e : *S. Enteritidis* S003



ภาพที่ 47 PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม SIM และ SEP อายุ 14 วัน โดยใช้เชื้อเปรียบเทียบกับ ได้แก่ a : *L. acidophilus* b : *L. salivarius* KUB-AC21 c : *L. reuteri* KUB-AC5 d : *E. coli* E010 และ e : *S. Enteritidis* S003



ภาพที่ 48 PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม SIM และ SEP อายุ 21 วัน โดยใช้เชื้อเปรียบเทียบ ได้แก่ a : *L. acidophilus* b : *L. salivarius* KUB-AC21 c : *L. reuteri* KUB-AC5 d : *E. coli* E010 และ e : *S. Enteritidis* S003

10⁵-SIM10⁵-SEP10⁶-SIM10⁶-SEP10⁷-SIM10⁷-SEP

ภาพที่ 49 PCR-DGGE ของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม SIM และ SEP อายุ 28 วัน โดยใช้เชื้อเปรียบเทียบ ได้แก่ a : *L. acidophilus* b : *L. salivarius* KUB-AC21 c : *L. reuteri* KUB-AC5 d : *E. coli* E010 และ e : *S. Enteritidis* S003

2.4.1 การเปลี่ยนแปลงชนิดของจุลินทรีย์ในชุดทดลองแบบ SIM ที่ระดับการให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10^5 10^6 และ 10^7 CFU ต่อกรัม

การทดลองชุดที่ให้โปรไบโอติกพร้อมกับ *Salmonella* Enteritidis S003 (SIM) ทำการทดลองโดยเริ่มเลี้ยงไก่ตั้งแต่อายุ 1 วัน แบ่งเป็นกลุ่มควบคุม (CON-SIM) ซึ่งให้กินอาหารสูตรที่ไม่เติมโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 และให้ *Salmonella* Enteritidis S003 (SIM) ปริมาณ 10^6 cfu ในไก่ทุกตัว และกลุ่มที่ให้อาหารที่เติมโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ที่ระดับ 10^5 (LAB- 10^5 -SIM) 10^6 (LAB- 10^6 -SIM) และ 10^7 (LAB- 10^7 -SIM) CFU ต่อกรัมอาหาร และให้ *Salmonella* Enteritidis S003 (SIM) ปริมาณ 10^6 CFU ในไก่ทุกตัว

ในไก่อายุ 1 วัน พบเชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจด้วยเทคนิค PCR-DGGE ดังแสดงในภาพที่ 44 - 45 และ ตารางที่ 13 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในทุกกลุ่มยกเว้นกลุ่ม LAB- 10^7 -SIM มีความคล้ายกัน โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่พบได้ในทุกกลุ่ม ได้แก่ *Enterococcus faecium* *Enterococcus faecalis* และ *Staphylococcus vitulinus* โดยมีการเจริญของ *Enterococcus faecium* ได้ดีที่สุด และจุลินทรีย์ที่พบในบางกลุ่ม ได้แก่ *Lactobacillus sakei* ซึ่งพบในกลุ่มควบคุม 10^5 -SIM และ 10^7 -SIM และ *Lactobacillus salivarius* ซึ่งพบเฉพาะในกลุ่มควบคุมสำหรับในกลุ่ม 10^7 -SIM มีจุลินทรีย์ที่พบต่างจากกลุ่มอื่น ได้แก่ *Pseudomonas fluorescens* และ *Salmonella* Enteritidis และ *Lactobacillus reuteri* ซึ่งใกล้เคียงกับสายพันธุ์ KUB-AC5 PIL66 และ PIL73

ในไก่อายุ 7 วัน พบว่ามีความแตกต่างกันของจุลินทรีย์ที่พบในกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ให้โปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ดังแสดงในภาพที่ 44 และ 46 และ ตารางที่ 14 พบว่ากลุ่มควบคุมไม่พบ *Enterococcus faecium* แสดงว่าการให้ไก่ได้รับโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ในช่วง 1-7 วัน ช่วยส่งเสริมการเจริญของ *Enterococcus faecium* ได้ และพบว่ากลุ่ม LAB- 10^7 -SIM เมื่อได้รับอาหารที่ให้โปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 มีจุลินทรีย์ที่พบลดลงจากที่อายุ 1 วัน พบ 9 ชนิด และอายุ 7 วัน พบ 2 ชนิด ทำให้มีกลุ่มของจุลินทรีย์ที่พบมีความคล้ายกับที่พบใน LAB- 10^5 -SIM และ LAB- 10^6 -SIM แสดงว่าเมื่อไก่มีอายุเพิ่มมากขึ้นในช่วงอายุ 1-7 วัน และการได้รับโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลุ่มจุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ส่วนเจจูนัมได้ โดยพบว่าในกลุ่มที่ให้โปรไบโอติกมีจุลินทรีย์ที่คล้ายกันและต่างจากกลุ่มควบคุม จากผล

ตารางที่ 13 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM อายุ 1 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)			
	CON-SIM	10 ⁵ -SIM	10 ⁶ -SIM	10 ⁷ -SIM
แบคทีเรียกรดแลกติก				
<i>Enterococcus faecalis</i>	50	25	50	50
<i>Enterococcus faecium</i>	100	100	100	100
<i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5	0	0	0	25
PIL73	0	0	0	25
PIL66	0	0	0	50
<i>Lactobacillus sakei</i>	75	75	0	25
<i>Lactobacillus salivarius</i>	25	0	0	0
จุลินทรีย์ชนิดอื่น				
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	0	0	25
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0	0	0	25
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	25	50	25	25

ตารางที่ 14 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM อายุ 7 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)			
	CON-SIM	10 ⁵ -SIM	10 ⁶ -SIM	10 ⁷ -SIM
แบคทีเรียกรดแลคติก				
<i>Enterococcus faecium</i>	0	75	100	100
<i>Lactobacillus crispatus</i>	0	25	0	0
<i>Lactobacillus sakei</i>	25	0	25	0
<i>Lactobacillus reuteri</i>	25	0	0	0
จุลินทรีย์ชนิดอื่น				
<i>Janthinobacterium lividum</i>	25	0	0	0
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	100	100	100	100

ในไก่อายุ 14 วัน พบว่ามีจุลินทรีย์ที่พบหลากหลายเพิ่มขึ้นมากกว่าที่อายุ 7 วัน โดยพบจุลินทรีย์ 7-12 ชนิด ดังแสดงในภาพที่ 44 และ 47 และ ตารางที่ 15 พบว่าทุกกลุ่มมีจุลินทรีย์ที่ตรวจพบส่วนใหญ่มีความแตกต่างกัน สำหรับจุลินทรีย์ที่พบในทุกกลุ่ม ได้แก่ *Lactobacillus johnsonii* *Lactobacillus reuteri* และ *Pseudomonas* sp. โดยกลุ่ม LAB-10⁶-SIM เป็นกลุ่มที่ส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* ได้ดีที่สุด และพบ *Escherichia coli* ในกลุ่ม LAB-10⁷-SIM ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคทำให้อาจมีผลกระทบต่อสุขภาพของไก่ได้ และไม่พบการเจริญของ *Enterococcus faecium* ในกลุ่มนี้

ตารางที่ 15 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM อายุ 14 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)			
	CON-SIM	10 ⁵ -SIM	10 ⁶ -SIM	10 ⁷ -SIM
แบคทีเรียกรดแลคติก				
<i>Enterococcus faecium</i>	0	50	50	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	75	50	0	0
<i>Lactobacillus crispatus</i>	0	0	75	50
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	50	25	25	25
<i>Lactobacillus reuteri</i>	25	25	75	25
<i>Lactobacillus salivarius</i>	0	75	50	50
KUB-AC21	75	0	0	0
<i>Streptococcus pasteurianus</i>	0	25	0	0
<i>Weissella</i> sp.	50	0	50	25
จุลินทรีย์ชนิดอื่น				
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	50
<i>Pseudomonas</i> sp. jS24	25	25	0	0
M9-3	50	50	50	100
<i>Pseudomonas putida</i> M	0	25	0	0
Z24zhy	0	25	0	0
<i>Staphylococcus kloosii</i>	0	25	0	50
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	50	25	0	25

ในไก่อายุ 21 วัน จุลินทรีย์ที่ตรวจพบมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้โปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ดังแสดงในภาพที่ 44 และ 48 และ ตารางที่ 16 โดยกลุ่มควบคุมพบจุลินทรีย์เพียง 2 ชนิด คือ *Enterococcus faecium* และ *Pseudomonas* sp. แต่กลุ่มที่ให้โปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 พบเชื้อจุลินทรีย์มากกว่ากลุ่มควบคุม ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus reuteri* LP970 และ KUB-AC5 และ *Staphylococcus vitulinus* เมื่อพิจารณาเฉพาะกลุ่มที่พบ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 พบว่าไก่กลุ่ม LAB-10⁵-SIM LAB-10⁶-SIM และ LAB-10⁷-SIM สามารถส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ได้ โดยกลุ่ม LAB-10⁵-SIM และ LAB-10⁶-SIM มีค่าร้อยละของการพบเป็น 100% นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่ม LAB-10⁵-SIM และ LAB-10⁶-SIM มีการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus salivarius* ได้ดีกว่ากลุ่มอื่น และพบว่ากลุ่ม LAB-10⁵-SIM มีการเจริญของ *Lactobacillus johnsonii* ได้อีกด้วย

ตารางที่ 16 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM อายุ 21 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)			
	CON-SIM	10 ⁵ -SIM	10 ⁶ -SIM	10 ⁷ -SIM
แบคทีเรียกรดแลคติก				
<i>Enterococcus faecium</i>	100	100	100	100
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0	50	100	25
<i>Lactobacillus johnsonii</i> strain	0	50	0	0
<i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5	0	100	100	25
LP970	0	50	100	50
PIL73	0	50	0	50
<i>Lactobacillus salivarius</i>	0	75	100	0
จุลินทรีย์ชนิดอื่น				
<i>Pseudomonas</i> sp.	100	0	50	50
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0	0	25	0
<i>Staphylococcus kloosii</i>	0	0	25	0
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	0	50	75	50

ในไก่อายุ 28 วัน มีการเปลี่ยนสูตรอาหารใหม่เป็นอาหารระยะที่ 2 และไม่ให้โปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ทุกกลุ่ม พบว่าจุลินทรีย์ที่พบในทุกกลุ่มมีความแตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 44 และ 49 และ ตารางที่ 17 พบว่ากลุ่มควบคุมมีการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายเพิ่มมากขึ้นกว่าที่ 21 วัน ที่พบเพียง 2 ชนิด เป็น 15 ชนิด แสดงว่าเมื่อมีการเปลี่ยนสูตรอาหารจะส่งผลถึงการเปลี่ยนแปลงกลุ่มของจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่ส่วนเจจูนัมได้ นอกจากนี้พบในกลุ่ม LAB-10⁷-SIM มีจุลินทรีย์ที่พบได้แตกต่างจากกลุ่มอื่น คือ *Lactococcus lactis* และ *Corynebacterium* sp. สำหรับกลุ่มที่ให้โปรไบโอติกพบการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ได้ดีที่สุด คือ กลุ่ม LAB-10⁵-SIM ซึ่งพบการเจริญได้ดีกว่ากลุ่ม LAB-10⁶-SIM และ LAB-10⁷-SIM แสดงว่าการให้โปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ที่ระดับ 10⁵ cfu ต่อกรัมอาหาร ทำให้มีการเจริญ และการคงอยู่ของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 แม้จะไม่ได้กินเข้าไปในช่วงอายุ 21-28 วัน ยังคงพบการเจริญได้เช่นเดิมในลำไส้ไก่ส่วนเจจูนัมได้ดีที่สุด จากผลการทดลองพบว่าระดับปริมาณของโปรไบโอติกที่ดีที่สุดคือ LAB-10⁵-SIM ซึ่งพบได้ดีที่ 21 วัน และในระหว่าง 21-28 วัน ยังคงสามารถตรวจพบได้ แสดงว่าสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่องมาจากการพบที่อายุ 21 วัน

ตารางที่ 17 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM อายุ 28 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)				
	CON-SIM	10 ⁵ -SIM	10 ⁶ -SIM	10 ⁷ -SIM	
แบคทีเรียกรดแลคติก					
<i>Enterococcus faecium</i>	100	75	100	100	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	25	100	50	100	
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	100	0	50	0	
<i>Lactobacillus reuteri</i> C1	50	0	0	0	
	KUB-AC5	75	75	0	25
	LP970	100	100	75	100
	PIL66	100	0	0	0
	PIL73	100	100	75	75
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	0	0	0	25
<i>Lactobacillus salivarius</i>	KUB-AC21	75	100	75	75
	<i>Lactobacillus vaginalis</i>	75	0	0	0
<i>Lactococcus lactis</i>	0	0	0	100	
จุลินทรีย์ชนิดอื่น					
<i>Arthrobacter</i> sp.	100	25	0	0	
<i>Corynebacterium</i> sp.	0	0	0	100	
<i>Escherichia coli</i>	0	25	75	0	
<i>Pseudomonas</i> sp. M9-3	25	0	0	0	
	11M13	100	50	0	0
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	0	0	25	0	
<i>Staphylococcus kloosii</i>	75	25	75	100	
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	100	100	75	100	

2.4.2 การเปลี่ยนแปลงชนิดของจุลินทรีย์ในชุดทดลองแบบ SEP ที่ระดับการให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 10^5 10^6 และ 10^7 CFU ต่อกรัม

การทดลองชุดที่ให้โปรไบโอติกเป็นเวลา 2 วัน ก่อนการให้ *Salmonella* Enteritidis S003 (SEP) ทำการทดลองโดยเริ่มเลี้ยงไก่ตั้งแต่อายุ 1 วัน แบ่งเป็นกลุ่มที่ให้อาหารที่เติมโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ที่ระดับ 10^5 (LAB- 10^5 -SEP) 10^6 (LAB- 10^6 -SEP) และ 10^7 (LAB- 10^7 -SEP) CFU ต่อกรัมอาหาร และให้ *Salmonella* Enteritidis S003 (SIM) ปริมาณ 10^6 cfu ในไก่ทุกตัว

ในไก่อายุ 1 วัน พบ *Enterococcus faecium* และ *Enterococcus faecalis* ในไก่ทุกตัว ดังแสดงในภาพที่ 45 และตารางที่ 18 สำหรับจุลินทรีย์ที่พบในบางกลุ่มได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus reuteri* PIL66 และ KUB-AC5 *Lactobacillus sakei* *Staphylococcus vitulinus* และ *Pseudomonas* sp.

ตารางที่ 18 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SEP อายุ 1 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)		
	10^5 -SEP	10^6 -SEP	10^7 -SEP
แบคทีเรียกรดแลคติก			
<i>Enterococcus faecalis</i>	75	50	100
<i>Enterococcus faecium</i>	100	100	100
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	50	0	0
<i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5	0	25	25
PIL66	0	0	25
<i>Lactobacillus sakei</i>	50	50	0
จุลินทรีย์ชนิดอื่น			
<i>Pseudomonas</i> sp.	0	0	25
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	100	0	50

ในไก่อายุ 7 วัน พบ *Enterococcus faecium* *Lactobacillus reuteri* และ *Staphylococcus vitulinus* ในไก่ทุกตัว ดังแสดงในตารางที่ 19 สำหรับจุลินทรีย์ที่พบได้ในบางกลุ่มคือ *Lactobacillus crispatus* พบในกลุ่ม LAB-10⁵-SEP และ LAB-10⁶-SEP *Lactobacillus sakei* พบในกลุ่ม LAB-10⁶-SEP และ LAB-10⁷-SEP และ *Janthinobacterium lividum* พบเฉพาะในกลุ่ม LAB-10⁷-SEP ซึ่งจากผลการทดลองพบว่ากลุ่ม LAB-10⁶-SEP มีการส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus* ได้ดีกว่ากลุ่มอื่น

ตารางที่ 19 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SEP อายุ 7 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)		
	10 ⁵ -SEP	10 ⁶ -SEP	10 ⁷ -SEP
แบคทีเรียกรดแลคติก			
<i>Enterococcus faecium</i>	75	100	100
<i>Lactobacillus crispatus</i>	50	50	0
<i>Lactobacillus reuteri</i>	25	75	25
<i>Lactobacillus sakei</i>	0	25	50
จุลินทรีย์ชนิดอื่น			
<i>Janthinobacterium lividum</i>	0	0	25
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	100	100	100

ในไก่อายุ 14 วัน พบ *Lactobacillus johnsonii* *Escherichia coli*. และ *Pseudomonas* sp M9-3 ในไก่ทุกกลุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 47 และตารางที่ 20 โดยกลุ่ม LAB-10⁷-SEP พบ *Escherichia coli* E010 ในไก่ 100% และไม่พบ *Lactobacillus reuteri* ซึ่งพบได้ในกลุ่มอื่น ๆ แสดงว่าที่อายุ 14 วัน ไก่กลุ่ม LAB-10⁵-SEP และ LAB-10⁶-SEP ส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* ได้ดีกว่า นอกจากนี้ยังพบการส่งเสริมการเจริญของ *Enterococcus faecium* *Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus salivarius* และ *Staphylococcus vitulinus* ในกลุ่ม LAB-10⁵-SEP และ พบ *Lactobacillus crispatus* *Lactobacillus salivarius* และ *Weissella* sp. ในกลุ่ม LAB-10⁶-SEP

ตารางที่ 20 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SEP อายุ 14 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)		
	10 ⁵ -SEP	10 ⁶ -SEP	10 ⁷ -SEP
แบคทีเรียกรดแลคติก			
<i>Enterococcus faecium</i>	25	0	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	50	0	0
<i>Lactobacillus crispatus</i>	0	25	0
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	25	50	100
<i>Lactobacillus reuteri</i>	25	25	0
<i>Lactobacillus salivarius</i>	0	25	0
KUB-AC21	25	0	0
<i>Weissella</i> sp.	0	25	0
จุลินทรีย์ชนิดอื่น			
<i>Escherichia coli</i>	25	25	100
<i>Pseudomonas</i> sp. M9-3	100	50	100
11M13	0	0	25
<i>Staphylococcus kloosii</i>	0	0	100
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	25	0	0

ในไก่อายุ 21 วัน พบ *Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus reuteri* *Lactobacillus salivarius* และ *Staphylococcus vitulinus* ในไก่ทุกกลุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 48 และ ตารางที่ 21 กลุ่ม LAB-10⁶-SEP พบ *Lactobacillus reuteri* และ *Enterococcus faecium* ในไก่ 100% และกลุ่ม LAB-10⁵-SEP พบ *Lactobacillus reuteri* ในไก่ 50% *Enterococcus faecium* ในไก่ 100% และพบ *Lactobacillus johnsonii* ในไก่ 25% สำหรับกลุ่ม LAB-10⁷-SEP แม้ว่าจะพบ *Lactobacillus reuteri* ในไก่ 50% แต่พบเชื้อก่อโรค *Escherichia coli* และ *Salmonella* Enteritidis ซึ่งไม่พบในกลุ่มอื่น จากผลการทดลองในไก่อายุ 21 วัน พบว่ากลุ่ม LAB-10⁵-SEP และ LAB-10⁶-SEP ส่งเสริมการเจริญของเชื้อที่มีประโยชน์ได้ดีกว่ากลุ่ม LAB-10⁷-SEP

ตารางที่ 21 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SEP อายุ 21 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)		
	10 ⁵ -SEP	10 ⁶ -SEP	10 ⁷ -SEP
แบคทีเรียกรดแลคติก			
<i>Enterococcus faecium</i>	100	100	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	25	100	50
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	25	0	0
<i>Lactobacillus reuteri</i>	50	100	50
<i>Lactobacillus salivarius</i>	50	100	50
จุลินทรีย์ชนิดอื่น			
<i>Escherichia coli</i>	0	0	25
<i>Pseudomonas</i> sp.	0	25	25
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0	0	50
<i>Staphylococcus kloosii</i>	25	0	0
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	100	75	50

ในไก่อายุ 28 วัน พบ *Enterococcus faecium* *Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 PIL73 และ LP970 *Lactobacillus salivarius* *Salmonella* Enteritidis *Staphylococcus kloosii* และ *Staphylococcus vitulinus* ในไก่ทุกกลุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 49 และ ตารางที่ 22 สำหรับกลุ่มที่พบการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ได้ดีคือ กลุ่ม LAB-10⁵-SEP และ LAB-10⁶-SEP โดยพบในไก่ 100% สำหรับกลุ่ม LAB-10⁷-SEP พบได้ในไก่ 50% และพบ *Lactococcus lactis* และ *Corynebacterium* sp. ซึ่งพบได้เฉพาะในกลุ่มนี้

จากผลการทดลองทั้งหมดของกลุ่ม SEP พบว่ากลุ่ม LAB-10⁵-SEP และ LAB-10⁶-SEP สามารถส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ได้ดีกว่ากลุ่ม LAB-10⁷-SEP

ตารางที่ 22 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SEP อายุ 28 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)		
	10 ⁵ -SEP	10 ⁶ -SEP	10 ⁷ -SEP
แบคทีเรียกรดแลคติก			
<i>Enterococcus faecium</i>	100	75	75
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	100	100	100
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	0	50	50
<i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5	75	100	50
LP970	100	50	75
PIL73	50	50	50
<i>Lactobacillus salivarius</i>	100	100	75
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	0	0	25
<i>Lactococcus lactis</i>	0	0	25
จุลินทรีย์ชนิดอื่น			
<i>Arthrobacter</i> sp.	25	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp.	0	0	25
<i>Escherichia coli</i>	100	75	0
<i>Salmonella</i> Enteritidis	75	50	25
<i>Staphylococcus kloosii</i>	75	50	50
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	25	50	100

1.4.3 การเปรียบเทียบชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ในชุดทดลองแบบ SIM และ SEP

การพิจารณาผลการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ที่ระดับการให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 เท่ากันของสภาวะจำลองแบบ SIM และ SEP พบว่าไก่อายุ 1 วัน มีการเจริญของจุลินทรีย์ที่คล้ายคลึงกันในระหว่างกลุ่ม ดังแสดงในภาพที่ 45 และตารางที่ 23 ในไก่อายุ 7 วัน ดังแสดงในภาพที่ 46 และ ตารางที่ 24 พบการเจริญของ *Enterococcus faecium* และ *Staphylococcus vitulinus* ในไก่ 75%-100% และมีการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* ได้ดีในกลุ่มที่ให้โปรไบโอติกแบบ SEP นอกจากนี้ยังพบการเจริญของ *Lactobacillus crispatus* ได้ในกลุ่ม LAB-10⁵-SIM LAB-10⁵-SEP และ LAB-10⁶-SEP

ตารางที่ 23 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM และ SEP อายุ 1 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)					
	10 ⁵ -SIM	10 ⁵ -SEP	10 ⁶ -SIM	10 ⁶ -SEP	10 ⁷ -SIM	10 ⁷ -SEP
แบคทีเรียกรดแลคติก						
<i>Enterococcus faecalis</i>	25	75	50	50	50	100
<i>Enterococcus faecium</i>	100	100	100	100	100	100
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0	50	0	0	0	0
<i>Lactobacillus reuteri</i>						
KUB-AC5	0	0	0	25	25	25
PIL66	0	0	0	0	50	25
PIL73	0	0	0	0	25	0
<i>Lactobacillus sakei</i>	75	50	0	50	25	0
จุลินทรีย์ชนิดอื่น						
<i>Pseudomonas</i> sp.	0	0	0	0	0	25
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	0	0	0	25	0
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0	0	0	0	25	0
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	50	100	25	0	25	50

ตารางที่ 24 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM และ SEP อายุ 7 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)					
	10 ⁵ -SIM	10 ⁵ -SEP	10 ⁶ -SIM	10 ⁶ -SEP	10 ⁷ -SIM	10 ⁷ -SEP
แบคทีเรียกรดแลคติก						
<i>Enterococcus faecium</i>	75	75	100	100	100	100
<i>Lactobacillus crispatus</i>	25	50	0	50	0	0
<i>Lactobacillus reuteri</i>	0	25	0	75	0	25
<i>Lactobacillus sakei</i>	0	0	25	25	0	50
จุลินทรีย์ชนิดอื่น						
<i>Janthinobacterium lividum</i>	0	0	0	0	0	25
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	100	100	100	100	100	100

ในไก่อายุ 14 วัน พบจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในภาพที่ 47 และตารางที่ 25 สำหรับการเปรียบเทียบในกลุ่มที่มีระดับความเข้มข้นของโปรไบโอติกเท่ากันพบว่ากลุ่ม SIM ส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* และ *Lactobacillus salivarius* ได้ดีกว่ากลุ่ม SEP

ตารางที่ 25 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM และ SEP อายุ 14 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)					
	10 ⁵ -SIM	10 ⁵ -SEP	10 ⁶ -SIM	10 ⁶ -SEP	10 ⁷ -SIM	10 ⁷ -SEP
แบคทีเรียกรดแลคติก						
<i>Enterococcus faecium</i>	50	25	50	0	0	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	50	50	0	0	0	0
<i>Lactobacillus crispatus</i>	0	0	75	25	50	0
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	25	25	25	50	25	100
<i>Lactobacillus reuteri</i>	25	25	75	25	25	0
<i>Lactobacillus salivarius</i>	75	0	50	25	50	0
KUB-AC21	0	25	0	0	0	0
<i>Streptococcus pasteurianus</i>	25	0	0	0	0	0
<i>Weissella</i> sp.	0	0	50	25	25	0
จุลินทรีย์ชนิดอื่น						
<i>Escherichia coli</i>	0	25	0	25	50	100
<i>Pseudomonas</i> sp. jS24	25	0	0	0	0	0
M9-3	50	100	50	50	100	100
11M13	0	0	0	0	0	25
<i>Pseudomonas putida</i> M	25	0	0	0	0	0
Z24zhy	25	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus kloosii</i>	25	0	0	0	50	100
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	25	25	0	0	25	0

ในไก่อายุ 21 วัน แสดงผลความแตกต่างของจุลินทรีย์ที่พบระหว่างกลุ่มได้ อย่างชัดเจนดังแสดงในภาพที่ 48 และตารางที่ 26 กลุ่ม LAB-10⁵-SIM พบ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ได้ในไก่ 100% ซึ่งในกลุ่ม SEP พบได้ในไก่เพียง 50% นอกจากนี้ยังพบว่า ส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus johnsonii* *Lactobacillus reuteri* PIL73 และ LP970 และ *Lactobacillus salivarius* ได้ดีกว่ากลุ่ม SEP และที่ระดับ 10⁶ CFU ต่อกรัม พบว่ามีการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ได้คล้ายกัน แต่กลุ่ม LAB-10⁶-SIM พบการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* LP970 *Salmonella* Enteritidis และ *Staphylococcus kloosii* สำหรับที่ระดับ 10⁷ CFU ต่อกรัม พบว่ากลุ่ม LAB-10⁷-SEP ส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus salivarius* *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 *Escherichia coli* และ *Salmonella* Enteritidis ได้ดีกว่ากลุ่ม LAB-10⁷-SIM ซึ่งส่งเสริมการเจริญของ *Enterococcus faecium* *Lactobacillus reuteri* PIL73 และ LP970 ได้ดีกว่ากลุ่ม LAB-10⁷-SEP

ตารางที่ 26 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM และ SEP อายุ 21 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)					
	10 ⁵ -SIM	10 ⁵ -SEP	10 ⁶ -SIM	10 ⁶ -SEP	10 ⁷ -SIM	10 ⁷ -SEP
แบคทีเรียกรดแลคติก						
<i>Enterococcus faecium</i>	100	100	100	100	100	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	50	25	100	100	25	50
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	50	25	0	0	0	0
<i>Lactobacillus reuteri</i>						
KUB-AC5	100	50	100	100	25	50
LP970	50	0	100	0	50	0
PIL73	50	0	0	0	50	0
<i>Lactobacillus salivarius</i>	75	50	100	100	0	50
จุลินทรีย์ชนิดอื่น						
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	25
<i>Pseudomonas</i> sp.	0	0	50	25	50	25
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0	0	25	0	0	50
<i>Staphylococcus kloosii</i>	0	25	25	0	0	0
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	50	100	75	75	50	50

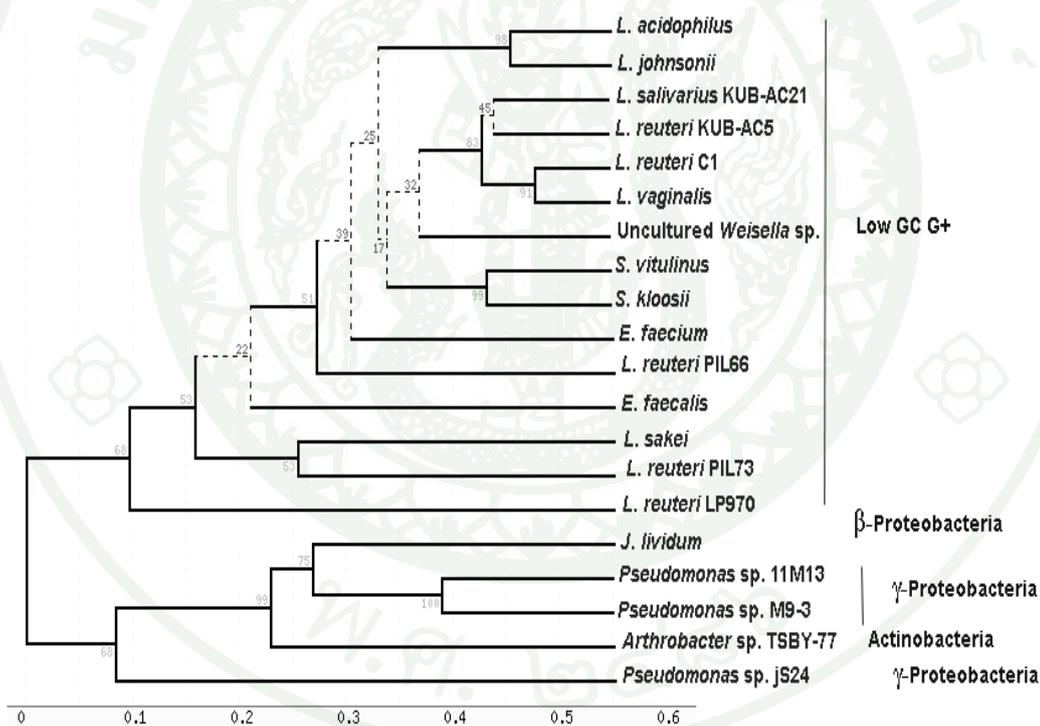
ในไก่อายุ 28 วัน พบว่าเมื่อหยุดให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 แล้วยังคงพบได้เช่นเดิมในทุกกลุ่มยกเว้นกลุ่ม LAB-10⁶-SIM ดังแสดงในภาพที่ 49 และตารางที่ 27 และจากการเปรียบเทียบที่ระดับการให้ 10⁵ CFU ต่อกรัม พบว่า LAB-10⁵-SIM สามารถส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ได้ดีกว่า LAB-10⁵-SEP และยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* Enteritidis และ *Escherichia coli* ได้ดีกว่ากลุ่ม LAB-10⁵-SEP ด้วยสำหรับที่ระดับ 10⁶ CFU ต่อกรัม พบว่ากลุ่ม LAB-10⁶-SEP ส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus salivarius* ได้ดีกว่ากลุ่ม LAB-10⁶-SIM สำหรับที่ระดับ 10⁷ CFU ต่อกรัม พบว่า LAB-10⁷-SEP มีการส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ได้ดีกว่ากลุ่ม LAB-10⁷-SIM แต่กลุ่มของ LAB-10⁷-SIM สามารถส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus salivarius* *Lactococcus lactis* และ *Corynebacterium* sp. ได้ดีกว่ากลุ่ม LAB-10⁷-SEP

ตารางที่ 27 จุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ไก่ชุด SIM และ SEP อายุ 28 วัน

จุลินทรีย์ที่พบ	ร้อยละของการพบในไก่ (%)					
	10 ⁵ -SIM	10 ⁵ -SEP	10 ⁶ -SIM	10 ⁶ -SEP	10 ⁷ -SIM	10 ⁷ -SEP
แบคทีเรียกรดแลคติก						
<i>Enterococcus faecium</i>	75	100	100	75	100	75
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	100	100	50	100	100	100
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	0	0	50	50	0	50
<i>Lactobacillus reuteri</i>						
KUB-AC5	75	75	0	100	25	50
LP970	100	100	75	50	100	75
PIL73	100	50	75	50	75	50
<i>Lactobacillus salivarius</i>	0	0	0	0	25	0
KUB-AC21	100	100	75	100	75	75
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	0	0	0	0	0	25
<i>Lactococcus lactis</i>	0	0	0	0	100	25
จุลินทรีย์ชนิดอื่น						
<i>Arthrobacter</i> sp.	25	25	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> sp.	0	0	0	0	100	25
<i>Escherichia coli</i>	25	100	75	75	0	0
<i>Pseudomonas</i> sp.	50	0	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0	75	0	50	0	25
<i>Staphylococcus</i> <i>gallinarum</i>	0	0	25	0	0	0
<i>Staphylococcus kloosii</i>	25	75	75	50	100	50
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	100	25	75	50	100	100

2.5 Phylogenetic tree ของจุลินทรีย์ที่พบในลำไส้เล็กส่วนเจจุนัมของไก่เนื้อ ภายใต้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003

จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของตัวอย่างแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลนำมาหาความสัมพันธ์ในรูปแบบ Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม Genebee กำหนดค่า Bootstrap 100 จากภาพที่ 50 พบว่าไก่กลุ่มควบคุมมีจุลินทรีย์ที่พบ 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม Low-GC G+ ประกอบด้วย จีโนส *Lactobacillus* *Weisella* *Staphylococcus* และ *Enterococcus* ซึ่งมีรายงานการพบว่าเป็นเชื้อประจำถิ่นที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของไก่ กลุ่ม Proteobacteria ได้แก่ *Janthinobacterium* และ *Pseudomonas* และกลุ่ม Actinobacteria ซึ่งมีรายงานการพบว่าเป็นเชื้อที่พบในสิ่งแวดล้อมบริเวณคอกรวมถึงวัสดุในการปูพื้น เช่น ฟาง และ แกลบ ซึ่งเชื้อเหล่านี้จะปนเปื้อนเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของไก่ได้

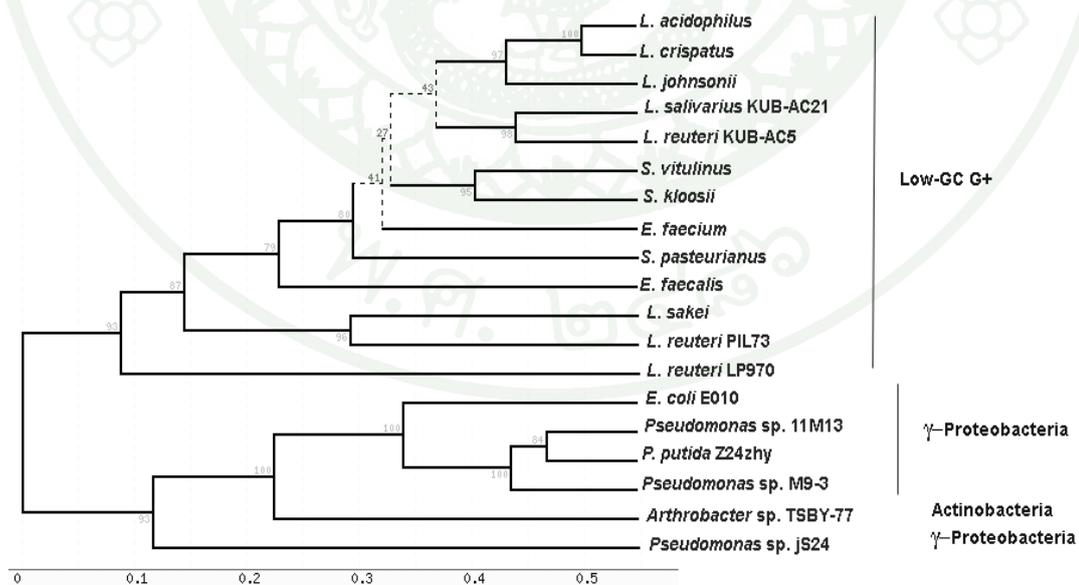


ภาพที่ 50 Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม ช่วงอายุ 1-28 วัน

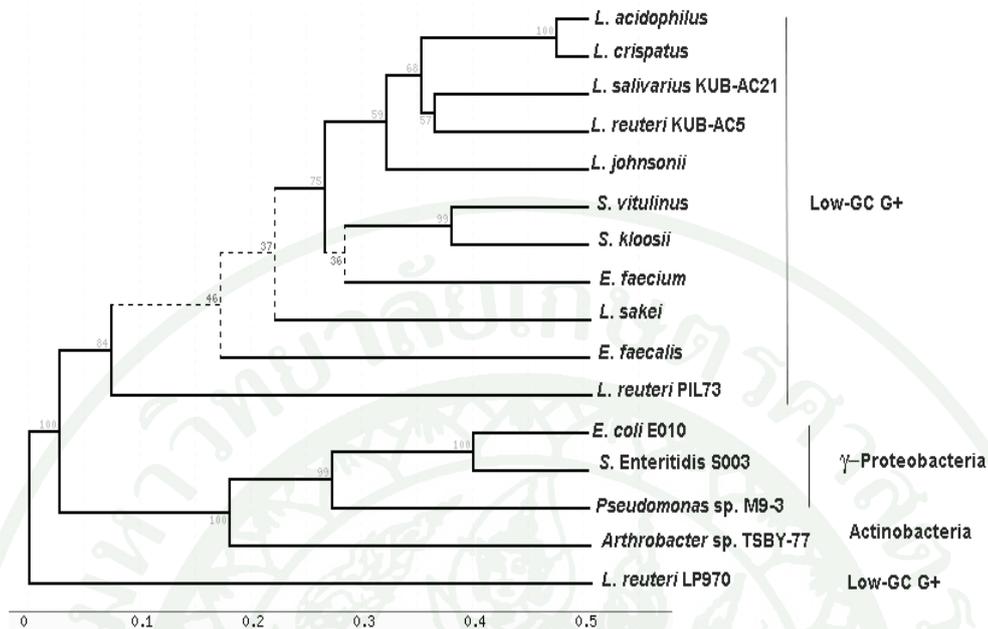
จากการเปรียบเทียบผลของ Phylogenetic tree ของการให้โปรไบโอติกที่ระดับ 10^5 cfu ต่อกรัม ภายใต้สภาวะแบบ SIM และ SEP ดังแสดงในภาพที่ 51 และ 52 พบว่ามีจุลินทรีย์ที่หลากหลายกว่าที่พบในกลุ่มควบคุมจากการเปรียบเทียบระหว่าง 2 แบบ พบว่ามีความแตกต่างกัน โดยแบบ SIM มีความหลากหลายมากกว่าแบบ SEP โดยในกลุ่ม SIM พบ *Streptococcus*

ที่ระดับการให้โปรไบโอติก 10^6 CFU ต่อกรัม พบความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่คล้ายคลึงกันทั้งแบบ SIM และ SEP โดยพบเฉพาะจุลินทรีย์กลุ่ม Low-GC G+ และ γ -Proteobacteria แต่กลุ่ม SIM พบการเจริญของ *Staphylococcus gallinarum* ดังแสดงในภาพที่ 53 และ 54

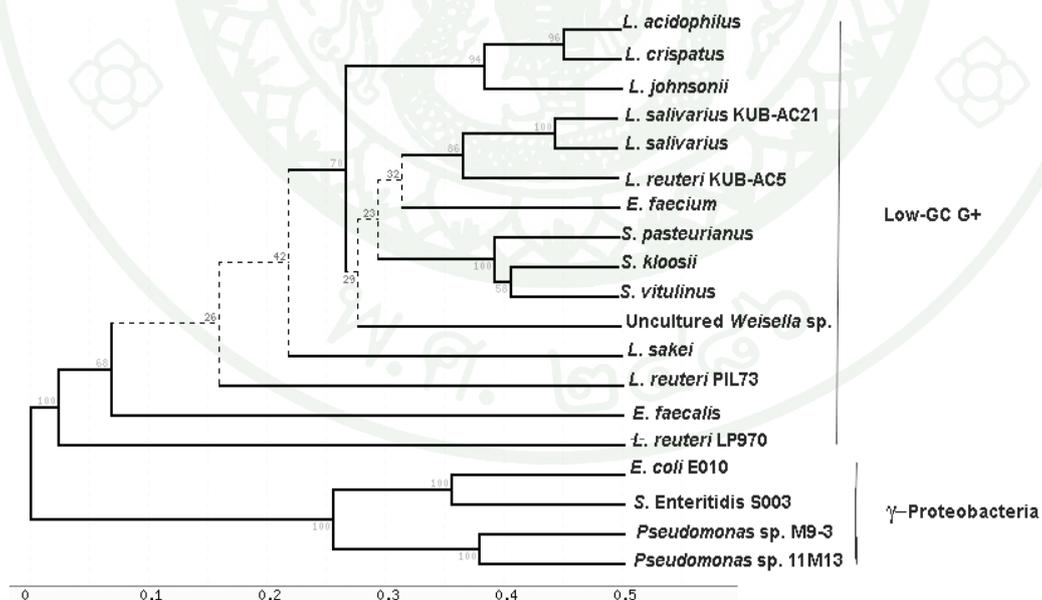
ที่ระดับการให้โปรไบโอติก 10^7 CFU ต่อกรัม พบว่ากลุ่ม SIM มีความหลากหลายของจุลินทรีย์มากกว่ากลุ่ม SEP ดังแสดงในภาพที่ 55 และ 56 โดยกลุ่ม SIM พบ *Lactobacillus crispatus* *Lactobacillus salivarius* Uncultured *Weissella* sp. และ *Pseudomonas fluorescens* LnSQ2 สำหรับกลุ่ม SEP พบ *Lactobacillus vaginalis* และ *Janthinobacterium lividum* แสดงว่ากลุ่ม SIM ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียได้สูงกว่ากลุ่ม SEP นอกจากนี้ยังพบ Uncultured *Corynebacterium* sp. และ *Lactococcus lactis* ได้เฉพาะในกลุ่มที่ให้โปรไบโอติก 10^7 CFU ต่อกรัมเท่านั้น



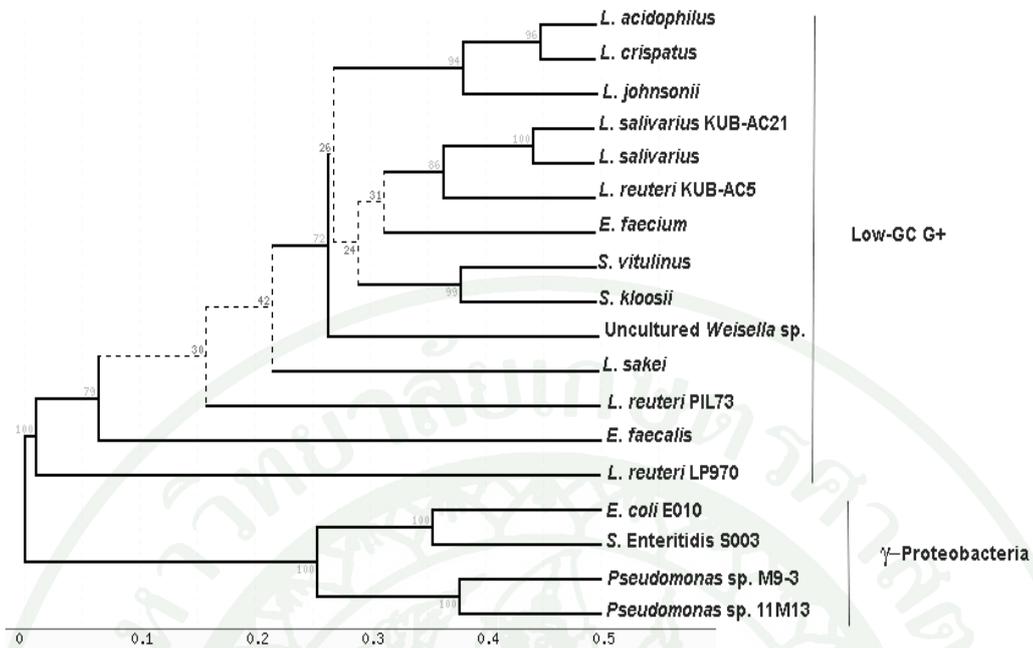
ภาพที่ 51 Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม LAB- 10^5 -SIM ช่วงอายุ 1-28 วัน



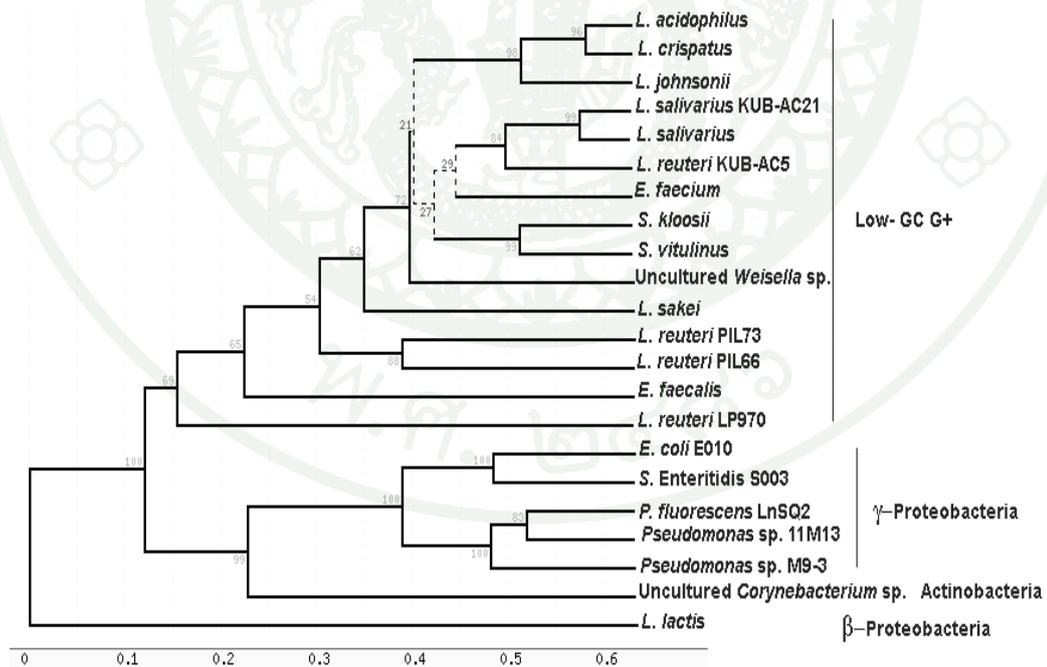
ภาพที่ 52 Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ใน
 ลำไส้ไก่กลุ่ม LAB-10⁵-SEP ช่วงอายุ 1-28 วัน



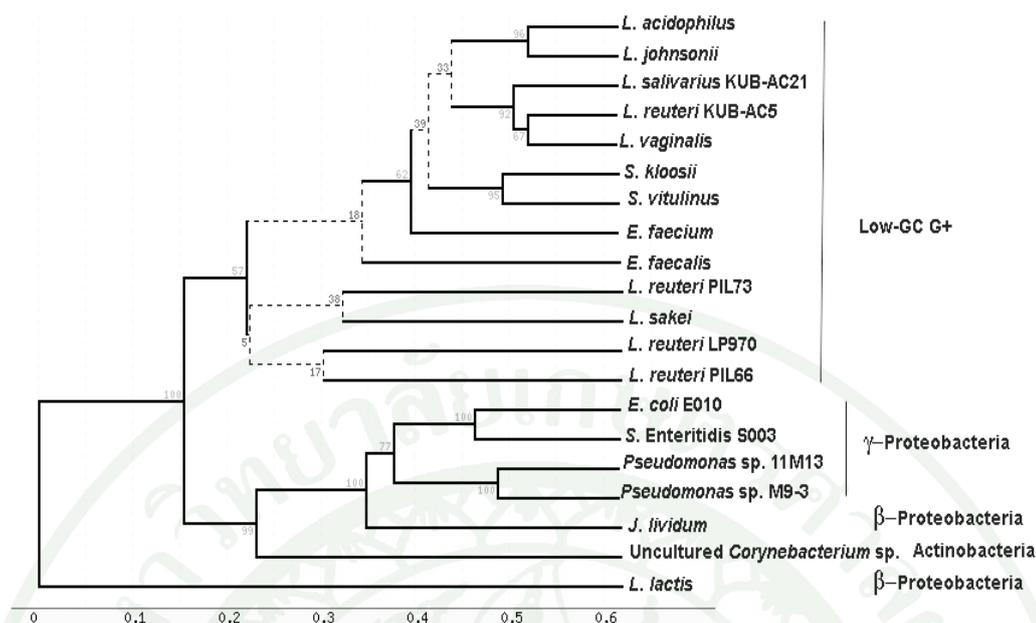
ภาพที่ 53 Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ใน
 ลำไส้ไก่กลุ่ม LAB-10⁶-SIM ช่วงอายุ 1-28 วัน



ภาพที่ 54 Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม LAB-10⁶-SEP ช่วงอายุ 1-28 วัน



ภาพที่ 55 Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม LAB-10⁷-SIM ช่วงอายุ 1-28 วัน



ภาพที่ 56 Phylogenetic tree โดยวิธี Phylip format แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่กลุ่ม LAB-10⁷-SEP ช่วงอายุ 1-28 วัน

จากผลการทดลอง PCR-DGGE พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงกลุ่มของจุลินทรีย์ได้ในกลุ่มที่ให้อาหารแตกต่างกัน ในไก่อายุ 14 วัน พบว่ากลุ่ม CON-SIM ซึ่งเป็นกลุ่มที่ให้อาหารสูตรควบคุมไม่พบ *Enterococcus faecium* ในลำไส้แต่สามารถพบได้ในกลุ่มที่ให้โปรไบโอติก LAB-10⁵-SIM LAB-10⁶-SIM และ LAB-10⁵-SEP แสดงว่าการให้โปรไบโอติกสามารถส่งเสริมการเจริญของ *Enterococcus faecium* นอกจากนี้ในกลุ่มโปรไบโอติกยังพบการเจริญของ *Lactobacillus crispatus* *Lactobacillus johnsonii* *Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus salivarius* *Lactobacillus reuteri* และ *Weissella* sp. ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Vahjen *et al.* (2002) ซึ่งพบว่า *Enterococcus faecium* สามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกในลำไส้เล็กของไก่ได้ โดยส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus* sp. ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Enterococcus faecium* สามารถส่งเสริมให้มีความสูงของวิลลัสในลำไส้เล็กของไก่กระทงได้ (Samli *et al.*, 2007) และมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกได้ (Simon, 2005; Stern *et al.*, 2006) ดังนั้นการพบ *Enterococcus faecium* ในกลุ่มที่ให้โปรไบโอติกที่อายุ 14 วัน จึงเป็นการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม *Lactobacillus* และส่งเสริมการพัฒนาคความสูงของวิลลัสได้ นอกจากนี้ที่อายุ 14 วัน สามารถพบความแตกต่างของจุลินทรีย์ระหว่างไก่แต่ละกลุ่มได้อย่างชัดเจนมากกว่าที่อายุ 7 วัน มีความสอดคล้องกับรายงานของ Amit-Romach *et al.* (2004) ซึ่งรายงานการพบจุลินทรีย์ในลำไส้ไก่ได้ทันทีหลังการฟัก แต่จุลินทรีย์ที่พบบางชนิดไม่ได้เป็น

ในไก่อายุ 21 วัน กลุ่มควบคุมพบจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ *Enterococcus faecium* และ *Pseudomonas* sp. แต่ในกลุ่มที่ให้โปรไบโอติกพบจุลินทรีย์ได้มากกว่าโดยพบ *Lactobacillus reuteri* PIL73 และ LP970 *Lactobacillus johnsonii* *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus salivarius* ได้ในกลุ่มต่าง ๆ สำหรับกลุ่มที่พบ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ได้ดีที่สุด คือ กลุ่ม LAB-10⁵ และพบได้เช่นเดิมที่อายุ 28 วัน แม้ว่าในช่วงอายุ 1-28 วัน จะให้อาหารที่ไม่เติมโปรไบโอติก แสดงว่าเชื้อสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนในลำไส้ได้เป็นอย่างดี และเมื่อพิจารณาการพบเชื้อชนิดอื่นที่ระดับการให้โปรไบโอติก 10⁵ CFU ต่อกรัม พบว่ากลุ่ม LAB-10⁵-SIM ให้ผลที่ดีกว่าเนื่องจากไม่พบการเจริญของ *Salmonella* Enteritidis และพบ *Escherichia coli* ในไก่ 25% ซึ่งน้อยกว่าการพบในกลุ่ม LAB-10⁵-SEP และพบการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* PIL73 และ LP970 *Lactobacillus johnsonii* *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus salivarius* ได้ดีกว่ากลุ่ม LAB-10⁵-SEP ซึ่งจากการพบกลุ่มเชื้อที่มีประโยชน์ในปริมาณมากและเป็นเชื้อที่มีรายงานว่าสามารถส่งเสริมการพัฒนาของวิลลัสได้เป็นอย่างดี (Pelicano *et al.*, 2005; 2007) จึงทำให้ไก่กลุ่ม LAB-10⁵-SIM มีความสูงของวิลลัสมากที่สุด

สำหรับที่ระดับการให้โปรไบโอติก 10⁶ CFU ต่อกรัม พบว่าที่อายุ 21 วัน ทั้ง 2 กลุ่มมีจุลินทรีย์คล้ายคลึงกันและมีการพบ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ได้ในไก่ทุกตัว แต่ที่อายุ 28 วัน พบ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ได้เฉพาะ LAB-10⁶-SEP เท่านั้น แสดงว่าผลของการปนเปื้อน *Salmonella* Enteritidis ในสภาวะที่ต่างกัน ส่งผลต่อการเจริญและเพิ่มจำนวนของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ในช่วงอายุ 21-28 วัน

สำหรับที่ระดับการให้โปรไบโอติก 10⁷ CFU ต่อกรัม พบว่าที่อายุ 21 วัน พบการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus salivarius* ในกลุ่ม LAB-10⁷-SEP ได้ดีกว่ากลุ่ม LAB-10⁷-SIM และที่อายุ 28 วัน ยังคงพบการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ได้ในทั้ง 2 กลุ่ม แต่มีปริมาณที่พบลดลง แสดงว่าการหยุดให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ในช่วงอายุ 21-28 วัน ส่งผลต่อปริมาณของเชื้อชนิดนี้ในลำไส้

จากผลการทดลองทั้งหมดพบว่าจุลินทรีย์ที่พบในลำไส้ในสภาวะการจำลองการปนเปื้อน *Salmonella Enteritidis* S003 2 แบบ มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับปริมาณของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ด้วย ซึ่งจากการทดลองนี้ได้ศึกษาผลของโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของไก่ ความสูงของวิลลัส ปริมาณจุลินทรีย์ และ PCR-DGGE พบว่าการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้จากที่แสดงใน PCR-DGGE มีความสัมพันธ์กับการพัฒนาความสูงของวิลลัสในลำไส้ โดยแสดงผลที่สอดคล้องกัน พบว่ากลุ่ม LAB-10⁵-SIM มีการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ได้ดีที่สุด และความสูงของวิลลัสมากที่สุด สำหรับผลการเจริญเติบโตพบว่ากลุ่ม LAB-10⁵-SEP ส่งเสริมน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นและมีอัตราการเปลี่ยนอาหารที่ดีที่สุด และผลของปริมาณจุลินทรีย์พบว่า LAB-10⁶-SEP มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียกรดแลกติกได้สูงที่สุด ซึ่งขัดแย้งกับผลการทดลองในส่วนอื่น ดังนั้นผลของปริมาณจุลินทรีย์จึงไม่สามารถบ่งชี้ปริมาณของจุลินทรีย์ที่แท้จริงในลำไส้ได้ เนื่องจากมีจุลินทรีย์บางชนิดในลำไส้ที่ไม่สามารถเจริญได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Knarreborg *et al.*, 2002)

สรุป

จากการศึกษาเปรียบเทียบการใช้โปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 และยาปฏิชีวนะต่อไก่เนื้อ พบว่าชุดทดลอง LAB-10⁷ ส่งเสริมการเจริญของไก่ได้ดีกว่าการใช้ยาปฏิชีวนะ avilamycin รวมทั้งการเจริญของวิลลัส และการเจริญของเชื้อที่มีประโยชน์ ได้แก่ *Enterococcus faecium* และ *Lactobacillus reuteri* และยับยั้งการเจริญของ *Streptococcus pasteurianus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคได้ และจากผลการเลี้ยงไก่ด้วยอาหารสูตรพื้นฐานที่เสริมโปรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 ภายได้สภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 2 แบบ คือ แบบ SIM เป็นสภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 พร้อมกับการให้เชื้อ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 และแบบ SEP เป็นสภาวะจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis S003 ภายหลังการให้เชื้อ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 2 วัน พบว่ากลุ่ม SIM มีความสูงของวิลลัสมากกว่ากลุ่ม SEP โดยกลุ่ม LAB-10⁵-SIM มีความสูงของวิลลัสมากที่สุด สำหรับผลต่อปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่ากลุ่ม SEP มีปริมาณมากกว่ากลุ่ม SIM โดยกลุ่ม LAB-10⁶-SEP มีปริมาณมากที่สุด และการศึกษาการเปลี่ยนแปลงชนิดของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค PCR-DGGE พบว่าในช่วงอายุ 1-7 วัน ไม่มีความแตกต่างของจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่มและเริ่มพบความแตกต่างได้ที่อายุ 14 วัน และพบได้มากยิ่งขึ้นเมื่อมีอายุ 21 วัน โดยในกลุ่ม CON-SIM พบจุลินทรีย์เพียง 2 ชนิด คือ *Enterococcus faecium* และ *Pseudomonas* sp. และไม่พบ *Lactobacillus reuteri* ซึ่งพบได้ทุกกลุ่มที่ให้โปรไบโอติก พบว่าที่ระดับ 10⁵ CFU ต่อกรัม กลุ่ม LAB-10⁵-SIM พบ *Lactobacillus reuteri* ที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ KUB-AC5 ได้ในไก่ทั้ง 100% นอกจากนี้ยังส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus salivarius* *Lactobacillus johnsonii* *Lactobacillus reuteri* PIL73 และ LP970 ได้ดีกว่ากลุ่ม SEP และที่ระดับ 10⁶ CFU ต่อกรัม พบว่ามีการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ได้คล้ายกัน สำหรับที่ระดับ 10⁷ CFU ต่อกรัม พบว่ากลุ่ม LAB-10⁷-SEP ส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus salivarius* ได้ดีกว่ากลุ่ม SIM และเมื่อหยุดการให้ *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 แล้วที่อายุ 28 วัน พบว่า LAB-10⁵-SIM สามารถส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus reuteri* ได้ดีที่สุด สำหรับที่ระดับ 10⁷ CFU ต่อกรัม พบว่าการเจริญของ *Lactococcus lactis* และ *Corynebacterium* sp. ได้

Lactobacillus reuteri KUB-AC5 มีผลต่อการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ การเจริญของวิลลัส และการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ภายในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม และจากการศึกษาตลอดช่วงอายุใน

การผลิต คือ 1-49 วัน ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ ซึ่งจะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาถึงผลของโปรไบโอติก และปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเจริญของไก่เนื้อในประเทศไทยได้เป็นอย่างดี



ข้อเสนอแนะ

1. จากผลการทดลองพบว่าในบางตัวอย่างไม่สามารถตรวจพบ *L. reuteri* KUB-AC5 ได้ เนื่องจากมีปริมาณต่ำกว่าปริมาณที่สามารถตรวจพบได้โดย DGGE และไม่สามารถบ่งชี้เป็นปริมาณได้ ซึ่งการบอกปริมาณจุลินทรีย์ที่พบได้อาจทำให้สามารถอธิบายผลของโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของไก่และผลต่อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาต่อด้วยวิธีที่ตรวจสอบจุลินทรีย์ที่มีปริมาณน้อยและบอกปริมาณที่พบได้ เช่น real-time PCR

2. จากการศึกษาพบว่าปริมาณจุลินทรีย์ 10^7 CFU ต่อกรัม มีแนวโน้มที่ส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตของไก่ แต่ยังคงแสดงผลต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของไก่ได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาในไก่ปริมาณที่มากขึ้นและอาศัยการวิเคราะห์ทางสถิติร่วมด้วย

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- วิโรจน์ จันทรัตน์. 2538. กายวิภาคและสรีรวิทยาของสัตว์เลี้ยง. เอกสารประกอบการสอนวิชา สป. 420. สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้, เชียงใหม่.
- ศุภลักษณ์ โรมนรัตน์. 2545. เทคนิคเนื้อเยื่อสัตว์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุวรรณ พรหมทอง. 2548. การศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสรีรวิทยา และจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารไก่กระตังที่ได้รับอาหารสูตรมันสำปะหลังกับอาหารสูตรข้าวโพด. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Amit-Romach, E., D. Sklan and Z. Uni. 2004. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. **Poult. Sci.** 83: 1093-1098.
- Ampe, F., N. Omar, C. Moizan, C. Wachter and J.-P. Guyot. 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 5464-5473.
- Apajalahti, J.H.A., L.K. Sarkilahti, B.R.E. Maki, J.P. Heikkinen, P.H. Nurminen and W.E. Holben. 1998. Effective recovery of bacterial DNA and percent-guanine –plus-cytosine-based analysis of community structure in the gastrointestinal tract of broiler chickens. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 4084-4088.
- Ashraf, M., M. Siddique, S.U. Rahman, M. Arshad and H.A. Khan. 2005. Effect of various microorganism culture feeding against Salmonella infection in broiler chicks. **J. Agri. Soc. Sci.** 1: 29-31.
- Baele, M., L.A. Devriese, P. Butaye and F. Haesebrouk. 2002. Composition of enterococci and streptococcal flora from pigeon intestines. **J. Apply Microbiol.** 92 : 348-351.

- Barbora, T.M., C.R. Serra, R.M.L. Ragione, M.J. Woodward and A.O. Henriques. 2005. Screening for *Bacillus* isolated in the broiler gastrointestinal tract. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 968-978.
- Bataye, P., Devriese L.A. and Haesebrouck F. 2005. Effect of avilamycin fed to chickens on *E. faecium* counts and on the selection of avilamycin-resistant *E. faecium* population. **Microb Drug Resist.** 11 : 170-177.
- Bayane, A., D. Roblain, R.D. Dauphin, J. Destain, B. Diawara and P. Thonart. 2006. Assessment of physiological and biochemical characterization of a *Lactic acid bacterium* isolated from chicken faces in sahelian region. **African Journal of Biotechnology.** 5: 629-634.
- Bjerrum, L., R.M. Engberg, T.D. Leser, B.B. Jensen, K. Finster and K. Pedersen. 2006. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. **Poult. Sci.** 85: 1151-1164.
- Bowman, J.P., S.A. McCammon, J.A.E. Gibson, L. Robertson and P.D. Nichols. 2003. Prokaryotic metabolic activity and community structure in antractic continental shelf sediments. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 2448-2463.
- Burr, M.D., S.J. Clark, C.R. Spear and A.K. Camper. 2006. Denaturing gradient gel electrophoresis can rapidly display the bacterial diversity contained in 16S rDNA clone libraries. **Microb. Ecol.** 51: 479-486.
- Casas, I.A. and W.J. Dobrogosz. 2000. Validation of the Probiotic Concept : *Lactobacillus reuteri* Confers Broad-spectrum Protection against Disease in human and Animals. **Microbial. Ecol. Health Dis.** 12: 247-285.
- _____, F.W. Edens and W.J. Dobrogosz. 1998. *Lactobacillus reuteri* : An effective probiotic for poultry and other animals, pp. 475-518. In S. Salminen and A. V. Wright (eds.) **Lactic Acid Bacteria : Microbiology and Functional Aspects.** B. Marcel

Dekker, New York.

Caspary, W.F. 1992. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. **Am. J. Clin. Nutr.** 55: 299-308.

Chadfield, M.S., J.P. Christensen, A. Decostere, H. Christensen and M. Bisgaard. 2007. Genotypic and phenotypic diversity of avian isolates of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis*) and associated diagnostic problems. **J. Clin. Microbiol.** 45 : 822-827.

Chandramouli, V., K. Kaiasapayhy, P. Peiris and M. Jones. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. **J. Microbiol. Met.** 56: 27-35.

Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Tech.** January: 164-167.

Don, R.H., P.T. Cox, B.J. Wainwright, K. Baker and J.S. Mattick. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucl. Acids Res.** 19: 4008.

Dumoncaux, T.J., J.E. Hill, S.M. Hemmingsen and A.G.V. Kessel. 2006. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. **Appl. Environ. Microbiol.** 72 : 2815-2823.

Edelman, S., B. Westerlund-Wikstrom, S. Leskela, H. Kettunen, N. Rautonen, J. Apajalahti and T.K. Korhonen. 2002. *In vitro* adhesion specificity of indigenous *Lactobacillus* within the avian intestinal tract. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 5155-5159.

Edens, F.W., C.R. Parkhurst, I.A. Casas and W.J. Dobrogosz. 1997. Principles of ex ovo competitive exclusion and in ovo administration of *Lactobacillus reuteri*. **Poul. Sci.** 76: 179-196.

Fodde, R. and M. Losekoot. 1994. Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). **Hum. Mutat.** 3: 83-94.

Fuller, R. 1992. **Probiotics**. Chapman&Hall, London.

Gabriel, I., M. Lessire, S. Mallet and J.F. Guillot. 2006. Microflora of the digestive tract : critical factors and consequences for poultry. **World' s Polutry Science Journal.** 62: 499-511.

Gong, J., R.J. Forster, H. Yu, J.R. Chambers, P.M. Sabour, R. Wheateroft and S. Chen. 2002. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the ceca lumen. **FEMS Microb. Lett.** 208: 1-7.

Gopal, P.K., J. Prasad, J. Smart and H.S. Gill. 2001. *In vitro* adherence properties of *Lactobacilli rhamnosos* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 Strains and their antagonistic activity against an Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Int. J. Food Micro.** 67: 207-216.

Green, G.L., J. Brostoff, B. Hudspith, M. Michael, M. Mylonaki, N. Rayment, N. Staines, J. Sanderson, D.S. Rampton and K.D. Bruce. 2006. Molecular characterization of the bacteria adherent to human colorectal mucosa. **J. Appl. Microbiol.** 100: 460-469.

Gusils, C., S. Cuzzo and G. Oliver. 1999. Some probiotic properties of chicken *Lactobacilli*. **Can. J. Microbiol.** 45: 981-987.

_____, F. Sesma and S. Gonzalez. 2002. Examination of adhesion determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken. **Can. J. Microbiol.** 48: 34-42.

Hamsupo, K. 2005. **Production and formulation of lactic acid bacteria producing antimicrobial substances as chicken probiotic adjuncts**. Ph.D. thesis, Kasetsart University.

- Henriksoon, A., R. Szewzyk and P.L. Conway. 1991. Characteristics of the adhesive determinants of *Lactobacillus fermentum* 104. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 499-502.
- Hong, H. , A. Pruden and K.F. Reardon. 2007. Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage. **J. Microbiol. Methods.** 69: 52-64.
- Hori, T., S. Haruta, Y. Ueno, M. Ishii and Y. Igarashi. 2006. Direct comparison of single-strand conformation polymorphism (SSCP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to characterize a microbial community on the basis of 16S rRNA gene fragments. **J. Microbiol. Methods.** 66: 165-169.
- Janse, I., J. Bok, and G. Zwart. 2004. A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. **J. Microbiol. Methods.** 57: 279-281.
- Jeurissen, S.H.M., F. Lewis, J.D. Klis, J.M.J. Rebel and A.H.A.H.M. Huurne. 2002. Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity, integrity and functionality. **Curr. Issues Intest. Microbiol.** 3:1-14.
- Kabir, S.M.L., M.M. Rahman, M.B. Rahman, M.M. Rahman and S.U. Ahmed. 2004. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. **Int. J. Poult. Sci.** 3: 361-364.
- Knarreborg, A.,M.A. Simon, R.M. Engberg, B.B. Jensen and G.W. Tannock. 2002. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 5918-5924.

- Lopez, I., F.R. Larrea, L. Cocolin, E. Orr, T. Phister, M. Marshall, J. VanderGheynst and D.A. Mills. 2003. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial population in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 6801-6807.
- Lu, J., U. Idris, B. Harmon and C. Hofacre. 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 6816-6824.
- McBain, A.J., R.G. Bartolo, C.E. Catrenich, D. Charbonneau, R.G. Ledder, A.H. Rickard and S.A. Symmons. 2003. Microbial characterization of biofilms in domestic drains and the establishment of stable biofilm microcosms. **Appl. Environ. Microbiol.** 69 : 177-185.
- McDermott, P.F., P. Cullen, S.K. Hubert, S.D. McDermott, M. Bartholomew, S. Simjee, and D.D. Wagner. 2005. Changes in antimicrobial susceptibility of native *Enterococcus faecium* in chickens fed virginiamycin. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 4986-4991.
- McGarvey, J.A., W.G. Miller, S. Sanchez and L. Stanker. 2004. Identification of bacterial populations in dairy wastewaters by use of 16S rRNA gene sequence and other genetic markers. **Appl. Environ. Microbiol.** 70 : 4267-4275.
- Mountzouris, K.C., P. Tsirtsikos, E. Kalamara, S. Nitsch, G. Schatzmayr and K. Fegeros. 2007. Evaluation of efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. **Poult. Sci.** 86: 309-317.
- Murase, T., Y. Mito, K. Otsuki, R. Suzuki and S. Yamai. 2002. Nucleotide substitution in vanC-2 gene of *Enterococcus casseliflavus* isolated obtained from chickens. **Epidemiology and Infection.** 12 : 421-424.

- Murry, A.C., A. Hilton and R.J. Buhr. 2006. Effect of botanical probiotic containing *Lactobacilli* on growth performance and population of bacteria in the ceca, cloaca, and carcass rinse of broiler chickens. **Int. J. Poult. Sci.** 5 : 344-350.
- Muyzer, G., E.C. De Wall, and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 695-700.
- Netherwood, T., H.J. Gilbert, D.S. Parker and A.G. O'Donnell. 1999. Probiotic shown to change bacterial community structure in avian gastrointestinal tract. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 5134-5138.
- Nitisingprasert, S., V. Niphai, B. Bunyan, P. Sukyai, K. Doi and K. Sonomoto. 2000. Screening and Identification of Effective Thermotolerant lactic acid bacteria producing antimicrobial activity againsts *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. resistant to antibiotics. **Kasetsart J. (Nat.Sci.)**. 34: 387-400.
- _____, J. NaKayama and S. Sonomoto. 2004a. Antimicrobial substances producing thermotolerant lactic acid bacteria foodborne pathogens and their promising applications, pp. 96. **In The 4th JSPS-NRCT joint seminar development of thermotolerant microbial resources and their applications.** 7-10 November 2004. Kyushu Uni, Fukuoka, Japan.
- _____, N. Pungsungvorn, P. Wanchaithanawong, G. Loiseau and D. Montet. 2004b. *In Vitro* adhesion assay of lactic acid bacteria as a probiotic and pathogenic bacteria by simple microbiological and genetics methods, pp. 91 **In The 10th World Congress on Clinical Nutrition.** November 30-December 3, 2004. Phuket, Thailand.
- Ouwehand, A.C. ,P.V. Kirjavaineny, M.M. Gronlundp, E. Isolaurip and S.J. Salmineny. 1999. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. **Int. Dairy J.** 9: 623-630.

- Pascual, M., M. Hugas, J.I. Monfort and M. Garriga. 1999. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 4981-4986.
- Pedroso, A.A., J.F.M. Menten, M.R. Lambaia, A.M.C. Racanicci, F.A. Longo and J.O.B. Sorbara. 2006. Intestinal bacterial community and growth performance of chickens fed diets containing antibiotics. **Poult. Sci.** 85 : 747-752.
- Pelicano, E.R.L., P.A. Souza, H.B.A. Souza, D.F. Figueiredo, M.M. Boiago, S.R. Carvalho and V.F. Bordon. 2005. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. **Rev. Bras. Cienc. Avic.** 7 : 1-22.
- _____, P.A. Souza, H.B.A. Souza, D.F. Figueiredo and C.M.C. Amaral. 2007. Morphometry and ultra-structure of the intestinal mucosa of broiler fed different additive. **Rev. Bras. Cienc. Avic.** 9 : 173-180.
- Randazzo, C.L., S. Torriani, A.D.L. Akkermens, W.M. de Vos, and E.E. Vaughan. 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. **Appl. Environ. Microbiol.** 68: 1882-1892.
- Reid, G., H. Bialkowska, H.C. Mei and H.J. Busscher. 1999. Correlation between genetic ,physico-chemical surface characteristics and adhesion of four strains of *Lactobacillus*. **Col. Sur. B. Bio.** 13: 75-81.
- Rinkinen, M., K. Jalava, E. Westermarck, S. Salminen and A.C. Ouwehand. 2003. Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization. **Vet. Micro.** 92: 111-119.
- Salanitro, J.P., I.G. Blanke and P.A. Muirhead. 1974. Studies on the Cecal microflora of commercial broiler chickens. **Appl. Microb.** 28: 439-477.

- Samanya, M. and K. Yamauchi. 2002. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. *natto*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**. 133: 95-104.
- Samli, H.E., N. Senkoylu, F. Koc, M. Kanter and A. Agma. 2007. Effects of *Enterococcus faecium* and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and intestinal microbiota. **Arch. Anim. Nutr.** 61 : 42-49.
- Satokari, R.M., E.E. Vaughan, A.D.L. Akkermans, M. Saarela and W.M. Vos. 2001. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 504-513.
- Schneitz, C., L. Nuotio and K. Lounatma. 1993. Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer). **J. Appl. Bac.** 74: 290-294.
- Servin, A.L. and M.H. Coconnier. 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best Prac. Res. Cli. Gas.** 17: 741-754.
- Sigler, W.V., C. Miniaci and J. Zeyer. 2004. Electrophoresis time impacts the denaturing gradient gel electrophoresis-based assessment of bacterial community structure. **J. Microbiol. Methods.** 57: 17-22.
- Simon, O. 2005. Micro-organism as Feed Additives-Probiotics. **Advances in Pork Production.** 16 : 161-167.

- Stern, N.J., E.A. Svetoch, B.V. Eruslanov, V.V. Perelygin, E.V. Mitsevich, I.P. Mitsevich, V.D. Pokhilenko, V.P. Levchuk, O.E. Svetoch and B.S. Seal. 2006. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, Which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in chicken gastrointestinal system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 : 3111-3116.
- Sukyai, P. 2003. **Detection and partial characterization of antimicrobial substances produced by *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 , KUB-AC16 and KUB-AC20.** M.S. thesis. Kasetsart University, Bangkok.
- Sultana, K., Georgia G., N. Reynolds, R. Arumugaswamy, P. Peiris and K. Kailasapathy. 2000. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 47-55.
- Sun, X. 2004. **Broiler performance and intestinal alterations when fed drug-free diets.** M.S. Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia
- _____, A. McElroy, K.E. Webb, Jr. , A.E. Sefton and C. Novak. 2005. Broiler performance and intestinal alterations when fed drug-free diets. *Poult. Sci.* 84:1294-1302.
- Tannock, G.W. 1999. Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie. Van Leeuwenhoek.* 76: 265-278.
- _____, K. Munro, H.J.M. Harmsen, G.W. Welling, J. Smart and P.K. Gopal. 2000. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacilli rhamnosus* DR20. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2578-2588.
- _____, 2002. Molecular methods for exploring the intestinal ecosystem. *Br.J.Nutr.* 87: 199-201.

- Tarachai, P. and K. Yamauchi. 2000. Effects of luminal nutrient absorption, intraluminal physical stimulation and intravenous parenteral alimentation on the recovery responses of duodenal villus morphology following feed withdrawal in chickens. **Poult. Sci.** 79 : 1578-1585.
- Timmerman, H.M. 2006. Mortality and growth performance of broiler given drinking water supplemented with chicken-specific probiotics. **Poult. Sci.** 85: 1383-1388.
- Vahjen, W., A. Jadamus and O. Simon. 2002. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on selected bacterial groups in the small intestine of growing turkey poults. **Arch. Tierernahr.** 56 : 419-429.
- Vanrobaeys, M., P. D. Herdt, G. Charlier, R. Ducattelle and F. Haesebrouck. 1999. Ultrastructure of surface components of *Streptococcus gallolyticus* (*S. bovis*) strains of differing virulence isolated from pigeons. **Microbiol.** 145 : 335-342.
- Wagner, D.S., M.W. Friedrich, B. Wagner and A. Brune. 2003. Phylogenetic diversity, abundance and axial distribution of bacteria in the intestinal tract of two soil-feeding termites (*Cubitermes* spp.). **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 6007-6017.
- Waters, S.M., R.A. Murphy and R.F.G. Power. 2006. Characterisation of prototype Nurmi culture-based microbiological techniques and PCR-DGGE. **Int. J. Food Microbiol.** 110: 268-277.
- Wielen, P.W.J.J., D.A. Keuzenkamp, L.J.A. Lipman, F. Knapen and S. Biesterveld. 2002. Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth. **Microb. Eco.** 44: 286-293.
- Willis, W.L., C. Murray and C. Talbott. 2002. *Campylobacter* isolation trends of cage versus floor broiler chickens : a one year study. **Poult. Sci.** 82 : 629-631.

Yamauchi, K., and Y. Isshiki. 1991. Scanning electron microacopic observations on the intestinal villi in growing white leghorn and broiler chickens from 1 to 30 days of age. **Br. Poult. Sci.** 32: 67-78.

_____, K. Yamamoto and Y. Isshiki. 1993. Development of the intestinal villi associated with the increased epithelial cell mitosis in chickens. **Anim. Sci. Technol.** 64 : 340-350.

_____. 2002. Review on chicken intestinal villus histological aterations related with intestinal function. **J. Poult. Sci.** 39: 229-242.

Yasar, S. and J.M. Forbes. 1999. Performance and gastro-intestinal response of broiler chickens fed on cereal grain-brained foods soaked in water. **Br. Poult. Sci.** 40 : 65-76.

Yoruk, M.A., M. Gul, A. Hayirli, and M. Macit. 2004. The effects of supplementation of humate and probiotic on egg production and quality parameters during the late laying period in hens. **Poult. Sci.** 83: 84-88.

Zhu, X.Y., T. Zhong, Y. Pandya and R.D. Joerger. 2002. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. **Appl. Environ. Micrbiol.** 68: 124-137



ภาคผนวก



1. MRS (de Man Rogosa and Sharp)

Glucose	20.0	กรัม
Pentone	10.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Beef extract	8.0	กรัม
Sodium acetate	3.0	กรัม
Tri-ammoniumhydrogenphosphate	2.0	กรัม
Dipotassiumhydrogenphosphate	2.0	กรัม
20% mangesesulphate	1.0	กรัม
5%	1.0	มิลลิลิตร
magnesiumsulphateheptahydrate		
sorbitanmonostearate	1.0	มิลลิลิตร
Agar	14.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 5.0 ± 0.5 ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที

2. NB (Nutrient broth)

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที

3. Brain Heart Infusion agar (BHI)

Brain Heart Infusion	37.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Hemin (1% Soln)	5.0	มิลลิลิตร
Vitamin K1 (1% Soln)	0.05	มิลลิลิตร
L-Cysteine	2.0	มิลลิลิตร
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที



ตารางผนวกที่ 1 ปริมาณอาหารที่กิน (Feed intake) ของไก่ในช่วงอายุ 1-49 วัน

อาหาร	ปริมาณอาหารที่กิน (กิโลกรัม)			
	1-21 วัน	22-42 วัน	43-49 วัน	1-49 วัน
ควบคุม	1.214	2.693	0.960	4.867
ยาปฏิชีวนะ	1.227	2.704	0.800	4.731
LAB-10 ⁷	1.162	2.627	1.060	4.849

ตารางผนวกที่ 2 น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (Body weight gain) ของไก่ในช่วงอายุ 1-49 วัน

อาหาร	น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กิโลกรัม)			
	1-21 วัน	22-42 วัน	43-49 วัน	1-49 วัน
ควบคุม	0.749	1.252	0.580	2.581
ยาปฏิชีวนะ	0.799	1.423	0.146	2.368
LAB-10 ⁷	0.696	1.365	0.434	2.495

ตารางผนวกที่ 3 อัตราการเปลี่ยนอาหาร (Feed conversion ratio) ของไก่ในช่วงอายุ 1-49 วัน

อาหาร	อัตราการเปลี่ยนอาหาร			
	1-21 วัน	22-42 วัน	43-49 วัน	1-49 วัน
ควบคุม	1.621	2.151	1.655	1.886
ยาปฏิชีวนะ	1.536	1.900	5.479	1.998
LAB-10 ⁷	1.669	1.925	2.442	1.943

ตารางผนวกที่ 4 ความสูงของวิลลัสในลำไส้ไก่ในช่วงอายุ 1-49 วัน

อายุ (วัน)	ควบคุม	ยาปฏิชีวนะ	LAB-10 ⁷
1	188.75 ± 13.94	187.75 ± 22.31	227.50 ± 17.99
3	297.50 ± 38.34	260 ± 62	285 ± 39.48
7	325 ± 38.18	357 ± 82.45	372.25 ± 67.43
21	390.25 ± 11.1	357.25 ± 46.7	756.50 ± 133.99
42	1,006.25 ± 198.13	1,073.75 ± 251.14	941.88 ± 90.12
49	805 ± 96.18	810 ± 116.83	1,046.25 ± 190.15

ตารางผนวกที่ 5 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในลำไส้ไก่ในช่วงอายุ 1-49 วัน

อายุ (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log ₁₀ cfu ต่อกรัม)		
	ควบคุม	ยาปฏิชีวนะ	LAB-10 ⁷
1	5.21 ± 0.16	5.44 ± 0.19	5.37 ± 0.33
3	6.14 ± 1.44	5.97 ± 0.98	6.9 ± 0.54
7	7 ± 1.07	7.19 ± 0.28	7.41 ± 0.67
21	7.74 ± 0.38	8.16 ± 0.35	7.51 ± 0.79
42	7.91 ± 0.39	7.81 ± 1.87	7.68 ± 1.36
49	7.13 ± 1.3	7.65 ± 1.29	8.32 ± 0.41

ตารางผนวกที่ 6 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ไก่ในช่วงอายุ 1-49 วัน

อายุ (วัน)	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติก (log ₁₀ cfu ต่อกรัม)		
	ควบคุม	ยาปฏิชีวนะ	LAB-10 ⁷
1	4.83 ± 0.32	5.28 ± 0.54	5.67 ± 0.78
3	5.86 ± 1.14	5.29 ± 0.33	6.25 ± 0.49
7	6.15 ± 0.99	6.83 ± 0.5	6.85 ± 1.13
21	6.95 ± 0.79	7.06 ± 0.84	6.79 ± 1.23
42	7.39 ± 0.72	7.2 ± 1.45	7.15 ± 0.85
49	7.13 ± 1.2	7.14 ± 1.29	7.86 ± 0.57

ตารางผนวกที่ 7 ปริมาณอาหารที่กิน (Feed intake) ของไก่ในช่วงอายุ 1-28 วัน

อาหาร	ปริมาณอาหารที่กิน (กิโลกรัม)				
	1-7 วัน	8-14 วัน	15-21 วัน	22-28 วัน	1-28 วัน
CON-SIM	0.192	0.187	0.371	0.979	1.715
LAB-10 ⁵ -SIM	0.212	0.168	0.321	0.947	1.648
LAB-10 ⁶ -SIM	0.192	0.150	0.284	1.039	1.664
LAB-10 ⁷ -SIM	0.200	0.168	0.343	1.078	1.788
LAB-10 ⁵ -SEP	0.191	0.218	0.392	1.032	1.801
LAB-10 ⁶ -SEP	0.204	0.209	0.382	1.049	1.843
LAB-10 ⁷ -SEP	0.175	0.209	0.374	1.189	1.946

ตารางผนวกที่ 8 น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (Body weight gain) ของไก่ในช่วงอายุ 1-28 วัน

อาหาร	น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กิโลกรัม)				
	1-7 วัน	8-14 วัน	15-21 วัน	22-28 วัน	1-28 วัน
CON-SIM	0.104	0.217	0.289	0.423	1.032
LAB-10 ⁵ -SIM	0.089	0.150	0.323	0.394	0.955
LAB-10 ⁶ -SIM	0.090	0.155	0.299	0.461	1.005
LAB-10 ⁷ -SIM	0.088	0.178	0.294	0.480	1.039
LAB-10 ⁵ -SEP	0.099	0.201	0.352	0.485	1.136
LAB-10 ⁶ -SEP	0.098	0.194	0.322	0.466	1.079
LAB-10 ⁷ -SEP	0.091	0.218	0.312	0.488	1.108

ตารางผนวกที่ 9 อัตราการเปลี่ยนอาหาร (Feed conversion ratio) ของไก่ในช่วงอายุ 1-28 วัน

อาหาร	อัตราการเปลี่ยนอาหาร				
	1-7 วัน	8-14 วัน	15-21 วัน	22-28 วัน	1-28 วัน
CON-SIM	1.846	0.862	1.284	2.314	1.662
LAB-10 ⁵ -SIM	2.382	1.120	0.994	2.401	1.726
LAB-10 ⁶ -SIM	2.133	0.968	0.949	2.254	1.656
LAB-10 ⁷ -SIM	2.273	0.944	1.167	2.246	1.721
LAB-10 ⁵ -SEP	1.929	1.085	1.114	2.128	1.585
LAB-10 ⁶ -SEP	2.082	1.077	1.186	2.251	1.708
LAB-10 ⁷ -SEP	1.923	0.959	1.199	2.436	1.756

ตารางผนวกที่ 10 ความสูงของวิลลัสในลำไส้ไก่ในช่วงอายุ 1-28 วัน

อาหาร	ความสูงของวิลลัส (ไมครอน)				
	1 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	28 วัน
CON-SIM	174.5±31.26	252.5±50.13	423.5±38.89	441±9.89	479±49.59
LAB-10 ⁵ -SIM	124±10.39	288.5±37.43	409.25±69.81	492±14.42	513±44.06
LAB-10 ⁶ -SIM	202±9.93	293±54.95	303.5±76.59	408.67±40.51	485±59.57
LAB-10 ⁷ -SIM	185±1.63	294±61.58	309.25±92.52	334±62.23	496±138.59
LAB-10 ⁵ -SEP	199±10.65	270±39.49	312±8.83	400.67±91.24	511.67±35.47
LAB-10 ⁶ -SEP	210±1.07	284.5±53.10	319.67±105.19	371.33±87.32	393±32.10
LAB-10 ⁷ -SEP	117±53.27	229.5±11.47	242.67±33.49	346.25±72.08	410±67.37

ตารางผนวกที่ 11_ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในลำไส้ไก่ในช่วงอายุ 1-28 วัน

อาหาร	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (\log_{10} cfu ต่อกรัม)				
	1 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	28 วัน
ควบคุม	8.83±0.36	8.09±1.24	7.49±0.56	7.60±1.16	7.26±0.72
LAB-10 ⁵ -SIM	8.8±0.14	7.99±0.28	7.08±1.41	6.77±0.49	7.41±0.49
LAB-10 ⁶ -SIM	7.89±1.15	8.26±0.44	6.94±0.85	7.3±0.53	7.46±0.86
LAB-10 ⁷ -SIM	7.75±1.11	8.74±0.78	7.53±0.99	7.23±0.43	7.09±0.42
LAB-10 ⁵ -SEP	8.44±0.47	8.62±0.30	7.46±0.65	7.23±1.03	7.28±0.85
LAB-10 ⁶ -SEP	8.38±0.62	8.34±0.68	7.93±0.81	6.92±1.03	7.89±0.66
LAB-10 ⁷ -SEP	7.86±0.77	8.77±0.33	7.26±0.41	7.64±0.60	7.68±0.48

ตารางผนวกที่ 12 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ไก่ในช่วงอายุ 1-28 วัน

อาหาร	ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติก (\log_{10} cfu ต่อกรัม)				
	1 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	28 วัน
ควบคุม	8.93±0.32	7.94±0.95	7.18±0.28	7.83±0.75	7.44±0.68
LAB-10 ⁵ -SIM	7.95±1.09	8.11±0.81	7.68±0.72	6.25±0.88	7.41±0.52
LAB-10 ⁶ -SIM	8.05±1.05	7.19±1.01	6.60±0.79	6.89±0.78	7.26±1.07
LAB-10 ⁷ -SIM	7.77±1.08	8.16±0.97	7.09±1.11	7.03±0.61	6.94±0.53
LAB-10 ⁵ -SEP	7.89±0.97	8.38±0.35	7.16±0.91	7.19±0.69	7.09±0.98
LAB-10 ⁶ -SEP	7.80±0.76	7.92±1.06	7.36±0.34	6.94±0.59	7.77±0.55
LAB-10 ⁷ -SEP	7.94±0.95	8.59±0.81	7.15±0.39	6.69±0.61	7.46±0.45

ตารางผนวกที่ 13 ผล Blast ของแถบดีเอ็นเอจากเจล DGGE

Group	Class	Accession number	Genus or Species	% Identity
Low GC gram positive	<i>Enterococcaceae</i>	EU003448.1	<i>Enterococcus faecium</i> strain IDCC 2104	100
		DQ256270.1	<i>Enterococcus faecium</i> LP196.1	97
		DQ223887.1	<i>Enterococcus casseliflavus</i> strain P10	100
		AB362602.1	<i>Enterococcus faecalis</i> strain NRIC0113	99
	<i>Lactobacillaceae</i>	AB300550.1	<i>Lactobacillus reuteri</i> strain PIL73	100
		EF412975.1	<i>Lactobacillus reuteri</i> strain C1	97
		DQ256277.1	<i>Lactobacillus reuteri</i> isolate LP970	97
		AB300546.1	<i>Lactobacillus reuteri</i> PIL66	91
		AB300521.1	<i>Lactobacillus salivarius</i> strain PIL15	97
		DQ444477.1	<i>Lactobacillus salivarius</i>	97
		AB300536.1	<i>Lactobacillus vaginalis</i> strain PIL47	98
		AB186343.1	<i>Lactobacillus johnsonii</i> strain DLL 0902	98
		DQ676990.1	<i>Lactobacillus crispatus</i>	98
		EF053511.1	<i>Lactobacillus sakei</i> strain CRL1626	100
		EF059987.1	<i>Pediococcus acidilactici</i> strain UL5	98
		EF674499.1	Uncultured <i>Weissella</i> sp. isolate TTGE gel band 17	98

ตารางผนวกที่ 13 (ต่อ)

Group	Class	Accession number	Genus or Species	% Identity
Proteobacteria	<i>Listeriaceae</i>	S55472.1	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	98
	<i>Planococcaceae</i>	DQ112360.1	<i>Sporosarcina</i> sp. C4M5	97
	<i>Staphylococcaceae</i>	Z26898.1	<i>Staphylococcus kloosii</i>	98
		AM062694.1	<i>Staphylococcus vitulinus</i> isolate p212	100
		AY647303.1	<i>Staphylococcus gallinarum</i> strain MSU3410	100
	<i>Streptococcaceae</i>	EF670543.1	<i>Streptococcus pasteurianus</i> clone 9324-2	100
	<i>Peptostreptococcaceae</i>	AF481225.1	<i>Peptostreptococcus</i> sp. E3_32	93
	β	EF204211.1	<i>Janthinobacterium lividum</i> isolate H196	100
		DQ640007.1	<i>Janthinobacterium lividum</i>	98
	γ	AY348313.1	<i>Lactococcus lactis</i> Akira2	95
		EF418614.1	<i>Escherichia coli</i> strain WR	99
		AB294558.1	<i>Pseudomonas putida</i> strain NCB0308-456	100
		AY450555.1	<i>Pseudomonas putida</i> isolate M	100
		AM411067.1	<i>Pseudomonas putida</i> strain Z24zhy	99
		DQ536515.2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain BIHB 740	100
		AY158027.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain LnSQ2	99

ตารางผนวกที่ 13 (ต่อ)

Group	Class	Accession number	Genus or Species	% Identity
Proteobacteria	γ	EF044363.1	<i>Pseudomonas</i> sp. C6-2	98
		AY860451.1	<i>Pseudomonas</i> sp. jS24	99
		EF076789.1	<i>Pseudomonas</i> sp. M9-3	96
		AB206461.1	<i>Pseudomonas</i> sp. 11M13	99
		AY960273.1	Uncultured <i>Pseudomonadaceae</i> clone 942	99
		DQ316118.1	<i>Acinetobacter</i> sp. S0-A5-105	100
		EF179616.1	<i>Psychrobacter</i> marincola strain WP02-1-40-2	98
Actinobacteria		DQ173028.1	<i>Arthrobacter</i> sp. TSBY-76	94
		DQ173029.1	<i>Arthrobacter</i> sp. TSBY-77	100
		AY080983.1	Uncultured <i>Corynebacterium</i> sp. clone ck121	96
Unknown bacteria		DQ057409.1	Uncultured bacterium clone ci35	95

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวนันทพร พึ่งสังวร

เกิดวันที่ 10 กรกฎาคม 2515

สถานที่เกิด ชลบุรี

ประวัติการศึกษา วท.บ. (จุลชีววิทยา) เกียรตินิยมอันดับ 2 มหาวิทยาลัยบูรพา (พ.ศ. 2537)

วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2542)

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ระดับ 6

สถานที่ทำงานปัจจุบัน สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก

ผลงานทางวิชาการ

1. Sunee Nitisinprasert, Nuntaporn Pungsungvorn, Penkhae Wanchaitanawong, Gerard Loiseau and Didier Montet. 2006. *In vitro* adhesion assay of lactic acid bacteria, *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. by microbiological and PCR methods. Songklanakarin J. Sci. Technol. 28 (Suppl. 1), 99-106.
2. Sunee Nitisinprasert, Arpa Suveatvatanakul, Nuntaporn Pungsungvorn, Korakoch Hamsupo, Penkhae Wanchaitanawong, Didier Montet, Jiro Nakayama and Kenji Sonomoto. 2006. Characterization of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 and its effect to broiler performances and microbial diversity by PCR-DGGE. The 1st KSBB/TSB joint Symposium "Role of Biotechnology and Bioengineering in Development of Alternative Energy and Biochemical Feedstock". 12 January 2006. Siam City Hotel, Bangkok, Thailand. P.4.
3. Wachira Wanasantia, Nuntaporn Pungsungvorn, Piyanuch Boonkumklo, Jiro Nakayama, Kenji Sonomoto and Sunee Nitisinprasert. 2007. Probe design for quantification of *Lactobacillus reuteri* existing in chicken intestine by real-time PCR. Conference proceedings the 8th Asian Pacific Poultry Conference 2007 Science to solution. March 5-6, 2007. Awisstel Le Concorde Hotel, Bangkok, Thailand. pp. 342-347.