บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โปรไบโอติก (probiotics) มีรากศัพท์มาจากภาษากรีกซึ่งแปลกว่า "เพื่อชีวิต" (for life) และได้นำมาใช้เพื่อหมายถึงจุลินทรีย์ชนิดเดียวหรือจุลินทรีย์เชื้อผสม ซึ่งเมื่อนำไปเสริมในอาหารให้แก่คนและสัตว์ จะมีประโยชน์ต่อคนและสัตว์นั้น ๆ ก่อให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร และช่วยต้านทานจุลินทรีย์ก่อโรค (Schrezenmeir and Vrese, 2001) การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกนี้เป็นที่ยอมรับเนื่องจากโปรไบโอติกให้ประโยชน์ในการช่วยควบคุมจุลินทรียที่เป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ทำให้สัตว์มีสุขภาพดีขึ้น ลดความเครียด สัตว์สามารถใช้ประโยชน์จากอาหารได้ดีขึ้น และจัดเป็นตัวกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์อีกทางหนึ่งด้วย อนึ่งได้มีการนำจุลินทรีย์ที่จัดเป็นโปรไบโอติกมาใช้เป็นส่วนหนึ่งของอาหารคนมาเป็นเวลานานแล้ว เช่นแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ที่เป็นจุลินทรีย์หลักในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวและอาหารหมักหลายชนิด (Betoret et. al., 2003; Reuter et. al., 2002; Prasad et. al., 1999; Kalantzopoulos, 1997) โปรไบโอติกส์ยังได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรมด้วย (Mombelli, 2000; Kaur et. al., 2002) ในด้านการเกษตรนั้นได้มีการทดลองนำเอาแบคทีเรียโปรไบโอติกส์ไปใช้ได้ผลดีโดยผสมลงในอาหารสัตว์ที่ใช้เลี้ยงสุกร (Adami et. al., 1997; Pollman et. al.,1980; Ohashi et. al., 2004) และสัตว์ปีก (Alder and Damassa, 1980; Tsai et. al., 2005) และในสัตว์น้ำเช่น ปลา กุ้ง และ หอย (Gatesoupe, 1999; Ali, 2000; Nikoskelainen et. al., 2001; Robertson et.al., 2000)

Du Toit. และคณะ (1998) ทำการคัดแยกแบคทีเรียในกลุ่ม lactobacilli ที่มีศักยภาพเป็นเชื้อโปรไบโอติกจากมูลสุกรเพื่อนำไปใช้เป็นสารเสริมในอาหารสำหรับลูกสุกร โดยทำการคัดแยกบนพื้นฐานที่ว่าแบคทีเรียสามารถสร้าง antibacterial substances, ทน pH ที่เป็นกรดได้ ทนน้ำดี (bile salts) ได้ แล้วทำการบ่งชี้ไอโซเลทที่คัดแยกได้ด้วยวิธี DNA-DNA hybridization จากนั้นนำไอโซเลทที่บ่งชี้ว่าเป็นเชื้อ *Lactobacillus reuleri* BFE 1058, *L. johnsonii* BFE 1039 และ *L. juhnsonii* BFE 1061 ไปให้สุกรกินในปริมาณ $2x10^{12}$CFU/วัน พบว่าเชื้อผสมโปรไบโอติกนั้นมีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญของสุกรและช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลในเนื้อสุกรด้วย

De Angelis และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาคัดแยกแบคทีเรียในกลุ่ม lactobacilli ที่มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกจากมูลสุกรเพื่อนำไปผสมอาหารเม็ดสำหรับเลี้ยงสุกร โดยคัดแยกบนพื้นฐานที่ว่าแบคทีเรียนั้น ต้องทนสะภาวะที่มีน้ำดี, ทน pH ต่ำ, รอดชีวิตได้หลังผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) ทนความร้อนได้และสามารถสร้างสาร antibacterial substances หลังจากคัดแยกเชื้อแล้วนำไปจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธี 16S rRNA analysis พบว่า ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus*

reuteri, *L. mucosae*, *L. hitasatonis*, *L. rossiae* ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีศักยภาพเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกและสามารถที่จะนำไปผสมเป็นอาหารเม็ดได้

Casey และคณะ (2003) ได้รายงานผลการทดลองถึงการรอดชีวิตและคงอยู่ของ *Lactobacillus murinus* ในสุกรโดยให้ด้วยการกินผ่านระบบทางเดินอาหาร พบว่าหลังทำการทดสอบเป็นเวลา 40 วัน (baseline period 10 วัน ; administration period 21 วัน; postadministration period 9 วัน) โดยให้เชื้อนี้ในความเข้มข้นประมาณ $3x10^8$CFU/pig/day พบว่าเชื้อนี้สามารถรอดชีวิตและมีจำนวนอยู่ระหว่าง $4.7x16^7$-$1.3x10^8$ CFU/g ของมูลสุกร โดยพบว่าหลังจากหยุดให้อาหารผสมเชื้อโปรไบโอติกจะพบว่าเชื้อมีจำนวนลดลงและนอกจากนี้ยังพบว่าระหว่างที่มีการให้อาหารผสมเชื้อโปรไบโอติก สามารถลดจำนวนเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ได้ 87-98 % เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ในปี ค.ศ. 2006 Guerra และคณะ ได้ทำการศึกษา เชื้อโปรไบโอติกที่มีชีวิต 4 สายพันธุ์ คือ *Pediococus acdilactici* NRRL B-5627, *Lactbacillus lactis* subsp. *lactis* CECT 539, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* CECT 4043 และ *Enterococcus faecium* CECT 410 และ antibiotic (colistin sulfate) โดยเติมลงในอาหารลูกสุกรที่เพิ่งหย่านม พบว่าน้ำหนักของลูกสุกรในกลุ่มที่รับ antibiotic จะสูงที่สุด และ รองลงมาคือกลุ่มที่รับ probiotic โดยลูกสุกรกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักน้อยที่สุด นอกจากนี้ยังพบการลดลงของจำนวนของ coliform bacteria โดยลูกสุกรในกลุ่มที่ได้รับ antibiotic จะมีจำนวนโคลิฟอร์มแบคทีเรียต่ำสุด ถัดไปได้แก่สุกรที่ได้รับโปรไบโอติก โดยสุกรกลุ่มควบคุมจะพบโคลิฟอร์มแบคทีเรียสูงกว่าทั้งกลุ่มที่รับ antibiotic และ โปรไบโอติก อย่างมีนัยสำคัญ จากนั้นทำการศึกษาการมีชีวิตรอดในระบบทางเดินอาหาร (จำลองสภาวะระบบทางเดินอาหาร) พบว่าเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถรอดชีวิตในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารได้ เมื่อทำการศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -20°C ใน skim milk ซึ่งเป็น cryoprotective agent ที่ดี เป็นเวลา 3 เดือน จากนั้นตรวจผลโดยตรวจสอบการเจริญพบว่าเชื้อสามารถรอดชีวิตและเจริญได้เป็นอย่างดี

Guo และคณะ (2006) ได้คัดแยกหาเชื้อ *Bacillus subtilis* MA139 จากลำไส้ไก่เนื้อ มูลสุกร อาหารหมักดอง ดิน และสมุนไพรจีน ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* K88, *E. coli* K99, *Salmonella* Typhimurium และ *Staphylococcus aureus* และเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการเป็นโปรไบโอติกในสุกร โดยแบ่งกลุ่มสุกรออกเป็น 5 กลุ่มทดลอง โดยกลุ่มที่ 1 ให้อาหารปกติ จัดเป็น negative control กลุ่มที่ 2 ให้อาหารที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ flavomycin 16 mg/kg อาหาร จัดเป็น positive control กลุ่มที่ 3, 4 และ 5 ให้อาหารผสมสปอร์ของ *B.subtilis* MA139 ที่ความเข้มข้น 2.2×10^5, 2.2×10^6 และ 2.2×10^7 CFU/g อาหาร ตามลำดับ จัดเป็นกลุ่มทดสอบ หลังการเลี้ยงสุกรเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มสุกรที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมสปอร์ของ *B. subtilis* มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นสูงกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus* spp. ในขณะที่ช่วยลดจำนวนของ *Escherichia coli* ที่อยู่ในทางเดินอาหารของสุกรอีกด้วย

ในปี ค.ศ. 2007 De Angelis และคณะได้รายงานถึงเชื้อแบคทีเรียสองสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากมูลสุกร ได้แก่เชื้อ *Lactobacillus plantarum* 4.1 และ *Lactobacillus reuteri* 3S7 ซึ่งทำการศึกษาทดลองกับสุกรโดยให้ทางการกิน (10^{10} CFU of probiotic bacteria/day) พร้อมทั้งศึกษาความสามารถในการรอดชีวิตหลังผ่านระบบทางเดินอาหารและการคงอยู่หลังหยุดให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย โดยทำการนับจำนวนและบ่งชี้ชนิดรวมทั้งการจำแนกสายพันธุ์ ซึ่งพบว่าในลูกสุกรก่อนให้อาหารผสมโปรไบโอติกจะตรวจพบเชื้อ lactobacilli 5.85 -6.25 log CFU/g มูลสุกร หลังให้อาหารที่ผสมเชื้อ *Lactobacillus* เป็นเวลา 15 วันจะตรวจพบเชื้อ *Lactobacillus* อยู่ระหว่าง 7.85 - 8.5 log CFU/g มูลสุกร และ หลังการหยุดให้เชื้อเป็นเวลา 6 วันจะพบเชื้อ *Lactobacillus* อยู่ระหว่าง 7.54 - 7.84 log CFU/g มูลสุกร ซึ่งสูงกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนแม่สุกรในกลุ่มทดสอบพบเชื้อ *Lactobacillus* อยู่ระหว่าง 8.88 - 9.11 log CFU/g และในกลุ่มควบคุมพบเชื้อ *Lactobacillus* อยู่ระหว่าง 8.67 - 9.11 log CFU/g ซึ่งไม่พบความแตกต่างในสองกลุ่มนี้ ส่วนจำนวนเชื้อในวงศ์ *Enterobacteriaceae* ที่ตรวจในลูกสุกรก่อนการทดสอบจะตรวจพบเชื้อในกลุ่ม enterobacteria 5.70 log CFU/g ในกลุ่มทดสอบหลังจากให้เชื้อโปรไบโอติกเป็นเวลา 15 วัน ตรวจพบเชื้อ enterobacteria 3.65 log CFU/g ซึ่งตรวจพบในระดับที่ต่ำกว่าในกลุ่มควบคุมซึ่งพบเชื้อ enterobacteria 6.25 log CFU/g ส่วนในแม่สุกรตรวจพบเชื้อ enterobacteria ในกลุ่มทดสอบระหว่าง 5.33-4.88 log CFU/g ในระหว่างที่มีการให้เชื้อโปรไบโอติก และหลังจากหยุดให้เชื้อโปรไบโอติกเป็นเวลา 6 วัน ตรวจพบเชื้อ enterobacteria 6.0 log CFU/g วัน ส่วนในแม่สุกรกลุ่มควบคุมตั้งแต่ก่อนเริ่มการทดลองตลอดจนสิ้นสุดการทดลองตรวจพบเชื้อ enterobacteria เฉลี่ย 7.58 log CFU/g นอกจากนี้การให้อาหารเสริมด้วยเชื้อ *Lactobacillus* สามารถลดกิจกรรมของเอนไซม์ β-glucuronidase ในสุกรลงอีกด้วย

Nurmi and Rantala (1973) ได้ริเริ่มการใช้โปรไบโอติกในไก่ โดยพบว่าลูกไก่ที่แยกเลี้ยงจากแม่ไก่จะไวต่อการติดเชื้อซัลโมเนลลาได้ง่ายมากเพราะจุลินทรีย์เจ้าถิ่นในลำไส้ยังเจริญไม่เต็มที่ จากนั้นได้ให้สารละลายที่ได้จากภายในลำไส้ของไก่โตแก่ลูกไก่ พบว่าลูกไก่มีความต้านทานต่อเชื้อซัลโมเนลลาเพิ่มขึ้น โดยเรียกหลักการนี้ว่า “Nurmi Concept” ซึ่งทำให้สรุปได้ว่าจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์จะทำหน้าที่ป้องกันและต่อต้านเชื้อก่อโรคได้โดยกระบวนการที่เรียกว่า “Competitive Exclusion, CE” (Mead, 2000, Schneitz, 2005)

Cameron และ Carter (1992) ได้ทำการทดลองใช้โปรไบโอติกที่แยกได้จากไส้ตันของไก่สุขภาพดีเพื่อทดสอบการป้องกันการติดเชื้อ *Salmonella* Enteritidis PT4 ในไก่ โดยทำการพ่นโปรไบโอติกเป็นละอองใส่ที่ฟักไข่ให้แก่ไก่พันธุ์ Marshall อายุ 1 วัน เป็นเวลา 10 วินาที และเลี้ยงร่วมกับไก่ที่ได้รับการป้อนเชื้อ *Salmonella* Enteritidis PT4 ปริมาณ 10^4 CFU/ml จากนั้นตรวจหาเชื้อ *Salmonella* Enteritidis PT4 จากไส้ตันของไก่ที่อายุ 8, 29 และ 41 วัน พบว่าไก่ในกลุ่มที่ไม่ได้รับโปรไบโอติกมีปริมาณเชื้อซัลโมเนลลาในไส้ตันอยู่ระหว่าง 10^4 -10^7 CFU/g ส่วนไก่ที่ได้รับโปรไบโอติกตรวจพบเชื้อน้อยกว่าอย่างชัดเจน

เชิดชัย และคณะ (2540) พบว่าการผสมโปรไบโอติก *Bacillus toyoi* 0.05% ในอาหารไก่เนื้อ ทำให้กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันหลังทำการฉีดวัคซีนนิวคาสเซิลและวัคซีนเบอร์ซาอักเสบติดต่อ ใน 6 สัปดาห์ดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เสริมโปรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่การตอบสนองต่อวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อไม่แตกต่างกัน

Pascual และคณะ (1999) ได้ทดลองให้เชื้อ *Lactobacillus salivarius* ในไก่อายุ 1 วัน เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกป้องกันการติดเชื้อ *Salmonella* Enteritidis C-114 โดยให้เชื้อโปรไบโอติกแก่ไก่ผ่านทางสายยางเข้าสู่โพรงกระเพาะอาหารโดยตรง พบว่าสามารถกำจัดเชื้อก่อโรคออกมาได้หมดหลังจากเลี้ยงไก่เป็นเวลา 21 วันขึ้นไป และเมื่อทำการทดลองให้ *L. salivarius* ผสมในอาหารและน้ำสำหรับเลี้ยงไก่ ก็ได้ผลเช่นกันกับการให้ผ่านทางสายยาง และจากการทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตของ *L. salivarius* ที่ผสมในอาหาร พบว่าปริมาณ *L. salivarius* ซึ่งผสมในอาหารเพื่อเลี้ยงไก่ในระดับความเข้มข้น 10^5 CFU ต่อกรัมอาหารในวันแรก สามารถเพิ่มจำนวนและรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารของไก่ได้หลังจากผ่านไป 1 สัปดาห์

Vicente และคณะ (2007) ได้ทำการทดลองเลี้ยงไก่อายุหนึ่งวัน ด้วย *Lactobacillus* spp. ที่ผสมในอาหารที่เติม lactose 0.1 % เมื่อแบ่งไก่ออกเป็น 2 กลุ่มการทดลอง โดยกลุ่มแรกทำการ "challenge" ด้วยเชื้อ *Salmonella* Enteritidis (SE) และกลุ่มที่สองไม่ถูก "challenge" พบว่าไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มี *Lactobacillus* และ lactose 0.1 % มี body weight และ feed conversion ratio ดีกว่าไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารธรรมดาอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังพบว่าแม้ไก่ที่ถูก "challenge" ด้วยเชื้อโรคท้องร่วง *Salmonella* Enteritidis นั้น การให้ *Lactobacillus* และ lactose 0.1 % ยังคงส่งผลในการช่วยส่งเสริมการเจริญของไก่อย่างมีนัยสำคัญ โดยไม่พบความแตกต่างจากไก่ในกลุ่ม non-challenge ที่ได้รับ lactose ร่วมกับ probiotic ซึ่งสรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกช่วยรักษาและคงไว้ซึ่ง performance ของไก่แม้เมื่อถูก "challenge" ด้วยเชื้อโรคท้องร่วง *Salmonella* Enteritidis

ธวัชชัย โพธิ์เฮือง และคณะ (2547) รายงานถึงการใช้โปรไบโอติกว่าโปรไบโอติกที่ให้ผลดีนั้นมักให้ในไก่ที่มีอายุ 1 วัน หรือมีอายุน้อยๆ และเป็นการให้ก่อนที่จะได้รับเชื้อก่อโรค เนื่องจากไก่อายุน้อยยังไม่มีการพัฒนาของจุลินทรีย์ปกติในทางเดินอาหารจึงมีความไวต่อเชื้อก่อโรคมากกว่าไก่โตเต็มที่ จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไปและมีการทำงานร่วมกันอย่างเป็นระบบ ดังนั้นประสิทธิภาพของโปรไบโอติกจึงขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบ อายุ และเวลา ที่ไก่ได้รับโปรไบโอติก รวมทั้งการเก็บรักษาโปรไบโอติกอย่างเหมาะสม

ในประเทศไทยการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกส์ในการเลี้ยงสัตว์ยังไม่เป็นที่แพร่หลาย ที่มีการศึกษาทดลองส่วนใหญ่ จะมุ่งเน้นไปในการเพาะเลี้ยงกุ้ง เช่น กุ้งกุลาดำ (Rengpipat et. al., 1988) และกุ้งกราม (ทะเนตร, 2545) ดังนั้นจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจศึกษาเพื่อพัฒนาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโปรไบโอติกส์ในน้ำเหลือทิ้งจากการต้มเส้นขนมจีน เพื่อนำมาใช้ในการเลี้ยงสุกรและสัตว์ปีก ซึ่งจะเป็นการช่วยลดน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนที่จะปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อมอีกด้วย