ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46902

EFFECTS OF SYNBIOTICS ON STRESS, OXIDATIVE STRESS AND PATHOLOGY IN BROILERS UNDER CAECAL COCCIDIOSIS

SARAWAT CHALORSUNTISAKUL

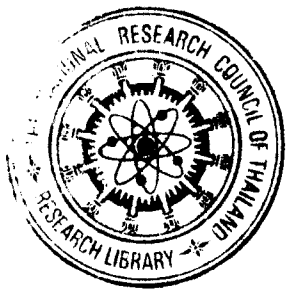
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN PHARMACY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
NOVEMBER 2010

b002 46507

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
E46902

EFFECTS OF SYNBIOTICS ON STRESS, OXIDATIVE STRESS AND PATHOLOGY IN BROILERS UNDER CAECAL COCCIDIOSIS



SURAWAT CHALORSUNTISAKUL

A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN

PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF

DOCTOR OF PHILOSOPHY

IN PHARMACY

THE GRADUATE SCHOOL

CHIANG MAI UNIVERSITY

NOVEMBER 2010

EFFECTS OF SYNBIOTICS ON STRESS, OXIDATIVE STRESS AND PATHOLOGY IN BROILERS UNDER CAECAL COCCIDIOSIS

SURAWAT CHALORSUNTISAKUL

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED

TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY

IN PHARMACY

EXAMINING COMMITTEE

.....CHAIRPERSON
Assoc. Prof. Dr. Jakkapan Sirithunyalug

.....MEMBER
Asst. Prof. Dr. Chaiyavat Chaiyasut

.....MEMBER
Asst. Prof. Dr. Worapol Aengwanich

.....MEMBER
Assoc. Prof. Dr. Busaban Sirithunyalug

.....MEMBER
Prof. Dr. Maitree Suttajit

THESIS ADVISORY COMMITTEE

.....ADVISOR
Assoc. Prof. Dr. Jakkapan Sirithunyalug

.....CO-ADVISOR
Asst. Prof. Dr. Chaiyavat Chaiyasut

.....CO-ADVISOR
Asst. Prof. Dr. Worapol Aengwanich

.....CO-ADVISOR
Assoc. Prof. Dr. Thanit Pewnim

8 November 2010

© Copyright by Chiang Mai University

ACKNOWLEDGEMENT

My deepest thanks with appreciation are given to my advisor and co-advisor, Assoc. Prof. Dr. Jakkapan Sirithunyalug, Asst. Prof. Dr. Chaiyavat Chaiyasut, Asst. Prof. Dr. Worapol Aengwanich and Assoc. Prof. Dr. Thanit Pewnim, who contributes to this thesis for their supervision, their patience, their sustained interest, their helpful guidance, and suggestion throughout this study.

I am very grateful to my former dean, Assoc. Prof. Dr. Vichai Korpraditsakul for his mercy that gives me the chances to do my thesis and the diligent technical assistance of Prof. Dr. Alan G. Mathew and Asst. Dr. Sarthorn Porntrakulpipat are gratefully appreciated.

I would like to extend my sincere gratitude to all my colleagues and one's beloved for their endless support. My special thanks are due to Dr. Charunee Kasornpikul for her kind help to me through.

But most of all, I am very grateful to my beloved Father and Mother, Mr. Kittisak and Mrs. Malai Chalorsuntisakul, who are always on my mind, for their unlimited support and love, also endless encouragement.

Surawat Chalorsuntisakul

Thesis Title	Effects of Synbiotics on Stress, Oxidative Stress and Pathology in Broilers Under Caecal Coccidiosis
Author	Mr. Surawat Chalorsuntisakul
Degree	Doctor of Philosophy (Pharmacy)
Thesis Advisory Committee	Assoc. Prof. Dr. Jakkapan Sirithunyalug Advisor
	Asst. Prof. Dr. Chaiyavat Chaiyasut Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Worapol Aengwanich Co-advisor
	Assoc. Prof. Dr. Thanit Pewnim Co-advisor

ABSTRACT

E46902

Intensive livestock and poultry rearing practices in recent years have led to an increase in animal stress and incidence of diseases. Intestinal infections are becoming increasingly prevalent in commercially-bred chicken and are inflicting severe economic losses on the poultry industry. One disease of particular concern is coccidiosis. The aim of this study was to investigate the influence of synbiotics on growth performance and stress status influence by *Eimeria tenella* presence in broilers. This research studied prebiotics properties of carbohydrates in celery cabbage, 3 varieties of onion, and 3 varieties of garlic by determination of total sugar content, reducing sugar content assay, molecular size determination of saccharides and sugar chemistry by thin layer chromatography. Suitable local plants extracts were subsequently selected as prebiotics for probiotics. The selected prebiotics and probiotics were further tested in broiler to examine growth

performance, selected oxidative biomarkers, and caecal morphology with and without *E. tenella* infection. The result indicated that among seven local plants screened for this study, only 4 local plants extracts namely onion, shallot, tree onion, and celery cabbage contained oligosaccharides. Only shallot extract and tree onion extract could be identifying as prebiotics. They were also suitable prebiotics for probiotics *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus fermentum*. When broilers were fed, average daily gain (ADG), feed intake (FI) and feed conversion ration (FCR) of all trials were not significantly different ($p>0.05$). However, when a comparison is made against the antibiotic-fed group, plant extracts from shallot and tree onion showed higher ADG, FI and greater FCR even though the differences are not statistically significant. However, *Lactobacillus plantalum* CMU-FP002 – treated group exhibited the highest ADG and FCR ($p<0.05$) but was not significantly different from the shallot extract – treated group, while the synbiotic-treated group was not different from the control. When challenged with *E. tenella*, the treated group with synbiotic showed certain antioxidation biomarkers. Malonaldehyde (MDA), Superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) increased but not as much as the non-treated group. Lymphocytes decreased from day 0 to day 6 and increased on days 9 and 12. Heterophils seemed to be increased on day 0 to day 6 and then decreased. Eosinophils increased in levels while Monocyte and Basophil did not significantly decrease. The lesions scoring at an average of 3.333 ± 0.500 were found in broiler-infected *E. tenella* group on day 12. In synbiotic treated group, high lesion score was also found but less than broiler- infected *E. tenella* group. The epithelium morphology with the gametocyte stage of *E. tenella* in synbiotic treated group was not clear and was not as severe in hemorrhage as in non - synbiotic treated group. In conclusion, the

E46902

synbiotics used seem to have certain levels of protection against *E. tenella* infection in broilers.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของซินไบโอติกต่อภาวะเครียด ภาวะเครียดออกซิเดชัน และพยาธิวิทยาในไก่กระทงติดเชื้อบิดไส้ตัน

ผู้เขียน นายสุรวัฒน์ ชลอสันติสกุล

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. จักรพันธ์ ศิริธัญญาลักษณ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
ผศ. ดร. ไชยวัฒน์ ไชยสุต	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ. น.สพ. ดร. วรพล เองวานิช	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
รศ. ดร. ธนิต ผิวนิ่ม	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

E46902

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันการเลี้ยงปศุสัตว์และการเลี้ยงสัตว์ปีกอย่างหนาแน่น ทำให้สัตว์เกิดภาวะเครียดและเพิ่มอุบัติการณ์ของโรค โดยเฉพาะการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารมีความชุกของโรคมากขึ้นในการเลี้ยงไก่เชิงพาณิชย์ ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมสัตว์ปีก หนึ่งในโรคที่มีความสำคัญ ได้แก่ โรคบิด วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่การศึกษาผลของซินไบโอติกต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตและภาวะเครียดที่เกิดจากอัยเมอเรีย เทเนลล่า การศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาคุณสมบัติของพรีไบโอติกจากผักกาดขาวปลี หอม 3 ชนิด (หอมใหญ่ หอมแขก หอมแดง) และกระเทียม 3 ชนิด (กระเทียมกลีบใหญ่ กระเทียมกลีบเล็ก กระเทียมโทน) ด้วยวิธีทดสอบน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ขนาดของคาร์โบไฮเดรต และวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีโครมาโตกราฟฟีเยื่อบาง และทำการคัดเลือกสารสกัดจากพืชที่เป็นพรีไบโอติกสำหรับโปรไบโอติก นำพรีไบโอติกที่คัดเลือกและโปรไบโอติกมาทดสอบในไก่กระทง โดยศึกษาสมรรถนะการเจริญเติบโต ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพออกซิเดชันบางชนิด และกายรูปวิทยาของไส้ตันที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้ออัยเมอ-เรีย ผลปรากฏว่าจากพืชท้องถิ่นจำนวน 7 ชนิด มีสารสกัดจากพืช 4 ชนิด ได้แก่ หอมใหญ่ หอมแดง หอมแขก และผักกาดขาวปลี ที่มีส่วนประกอบโอลิโกแซคคาไรด์ สารสกัดจากหอมแดงและหอมแขกที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก พรีไบโอติกที่ผ่านการคัดเลือกสามารถใช้เลี้ยงแบคทีเรียโปรไบโอติก 3 ชนิด ได้แก่ แลกโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลลัส แลกโตบาซิลลัส เบรวิส และแลกโตบาซิลลัส เฟอร์เมนตัมได้ เมื่อนำพรีไบโอติกที่คัดเลือกมาป้อนให้ไก่กระทง เพื่อวัดน้ำหนักที่

E46902

เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อวัน อัตราการกินได้ และอัตราการแลกเปลี่ยนอาหาร พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารปฏิชีวนะ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากหอมแดงและหอมแขกมีแนวโน้มของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อวัน อัตราการกินได้ และอัตราการแลกเปลี่ยนอาหารดีกว่า แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามกลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์โปรไบโอติก แลกโตบาซิลลัส แพลนทาลัม มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อวัน และอัตราการแลกเปลี่ยนอาหารดีที่สุด และไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากหอมแขก ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับซินไบโอติก ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม เมื่อป้อนอัยเมอรัย เทเนลล่า กลุ่มที่ได้รับซินไบโอติกแสดงตัวบ่งชี้ทางชีวภาพออกซิเดชัน มาลอนไดแอลดีไฮน์ ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตสและคาตาเลสเพิ่มขึ้นแต่ไม่มากเท่ากลุ่มที่ไม่ได้รับกลุ่มซินไบโอติก สำหรับลิมโฟซัยต์ พบว่ามีปริมาณลดลง จากวันแรกถึงวันที่ 6 และมีปริมาณเพิ่มขึ้นในวันที่ 9 และ 12 ส่วนเฮทเทอโรฟิล มีปริมาณเพิ่มขึ้นในวันแรกถึงวันที่ 6 จากนั้นจึงมีปริมาณลดลง ส่วนอีโอซิโนฟิล พบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้น ส่วนโมโนซัยต์และเบโซฟิล มีปริมาณลดลงอย่างไม่มีนัยยะสำคัญ สำหรับคะแนนรอยโรคของไก่กระทงในกลุ่มที่ได้รับอัยเมอเรีย เทเนลล่าเพียงอย่างเดียว เฉลี่ยเท่ากับ 3.333 $\pm$ 0.500 ในวันที่ 12 ส่วนในกลุ่มที่ได้รับซินไบโอติก พบว่ามีคะแนนรอยโรคสูง แต่น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับซินไบโอติก สำหรับกายรูปวิทยาของเยื่อบุ พบว่าระยะแกมีโตซัยต์ของอัยเมอรัย เทเนลล่าของไก่กระทง กลุ่มที่ได้รับซินไบโอติกไม่ชัดเจนและไม่พบภาวะเลือดออกที่รุนแรง เหมือนกลุ่มที่ไม่ได้รับซินไบโอติก โดยสรุปจากผลการศึกษาซินไบโอติก สามารถมีแนวโน้มลดความรุนแรงจากการติดเชื้ออัยเมอเรีย เทเนลล่าในไก่กระทงได้

TABLE OF CONTENTS

		Page
ACKNOWLEDGEMENT		**iii**
ABSTRACT (IN ENGLISH)		**iv**
ABSTRACT (IN THAI)		**vii**
LIST OF TABLES		**xiii**
LIST OF FIGURES		**xv**
ABBREVIATIONS AND SYMBOLS		**xvii**
CHAPTER 1	**INTRODUCTION**	**1**
	1.1 Statement and significance of the problem	1
	1.2 Purposes of the study	5
CHAPTER 2	**LITERATURE REVIEW**	**7**
	2.1 Poultry coccidiosis	7
	2.2 Coccidiosis in commercial broiler operations	9
	2.3 Coccidia life cycle	12
	2.4 Oxidative stress during Eimeria infection	19
	2.5 Prebiotics in plant preparation	21
	2.6 Prebiotics as animal feed additives	24
	2.7 Application of prebiotic diets for poultry	29
	2.8 Application of prebiotic diets for others animals	32
	2.9 Probiotics as animal feed additives	38
	2.10 Synbiotics as animal feed additives	44
CHAPTER 3	**MATERIALS AND METHODS**	**46**

	Page
3.1 Determination of prebiotics properties and the effect on growth of probiotic lactobacilli nourished by selected crude extract of local plants	46
3.1.1 Materials	46
3.1.2 Methods	48
3.1.2.1 Prebiotic extractions from selected crude extract of local plants	48
3.1.2.2 Oligosaccharides preparation	49
3.1.2.3 Total sugar assay	50
3.1.2.4 Reducing sugar assay	50
3.1.2.5 Size determine of prepared carbohydrates	50
3.1.2.6 Analysis of carbohydrate by thin layer chromatography (TLC)	51
3.1.2.7 Selection suitable local plants extract as prebiotics for probiotics	52
3.2 Influences of prebiotics, probiotics and synbiotics on growth performance of broilers	53
3.2.1 Materials	53
3.2.2 Methods	54
3.2.2.1 Determined the influence of prebiotics on growth performance of broilers	54

		Page
	3.2.2.2 Determined the influence of prebiotics, probiotics and synbiotics on growth performance of broilers	58
	3.3 Effect of synbiotics on stress, oxidative stress and Pathology of *Eimeria tenella* infection in broilers	60
	3.3.1 Materials	60
	3.3.2 Methods	62
	3.3.2.1 Prebiotic extractions	62
	3.3.2.2 Probiotics preparation	62
	3.3.2.3 Animals and experimental design	62
	3.3.2.4 Erythrocyte superoxide dismutase assay	63
	3.3.2.5 Erythrocyte catalase assay	64
	3.3.2.6 Assessment of plasma lipid peroxidation by thiobarbituric acid method	65
	3.3.2.7 Differential white blood cell count	66
	3.3.2.8 Effect of symbiotic on cecal morphology and lesion score in broiler infected *E. tenella*	67
CHAPTER 4	**RESULTS**	**71**
	4.1 Determination of prebiotics properties and the effect on growth of probiotic lactobacilli nourished by selected crude extract of local plants	71

		Page
	4.2 Influences of prebiotics, probiotics and synbiotics on growth performance of broilers	78
	4.3 Effects of synbiotics on stress, oxidative stress and Pathology of *Eimeria tenella* infection in broilers	85
CHAPTER 5	**DISCUSSIONS**	**107**
	5.1 Determination of prebiotics properties and the effect on growth of probiotic lactobacilli nourished by selected crude extract of local plants	107
	5.2 Influences of prebiotics, probiotics and synbiotics on growth performance of broilers	110
	5.3 Effects of synbiotics on stress, oxidative stress and Pathology of *Eimeria tenella* infection in broilers	112
CHAPTER 6	**CONCLUSIONS**	**118**
	6.1 Determination of prebiotics properties and the effect on growth of probiotic lactobacilli nourished by selected crude extract of local plants	118
	6.2 Influences of prebiotics, probiotics and synbiotics on growth performance of broilers	119
	6.3 Effects of synbiotics on stress, oxidative stress and Pathology of *Eimeria tenella* infection in broilers	119
REFERENCES		**121**
CURRICULUM VITAE		**156**

LIST OF TABLES

Table		Page
1	*Eimeria spp.* species of importance infecting chickens E. (*Eimeria spp.*), STM (Sporulation Time Minimum), MPP (Minimum prepatent period)	17
2	Percentage composition of diets fed to broilers	56
3	Total sugar and reducing sugar of selected local plants extracts	72
4	Degree of polymerization value (DP) of selected local plants extracts	73
5	R_f value of standard sugar from Thin Layer Chromatography (TLC)	74
6	R_f value of selected local plants from Thin Layer Chromatography (TLC)	75
7	Average daily gain of broilers in 38 day old	79
8	Feed intake of broilers in 38 day old	80
9	Feed conversion ratio of broilers in 38 day old	81
10	Average Daily Gain of broilers in 38 day old	82
11	Feed intake of broilers in 38 day old	83
12	Feed conversion ratio of broilers in 38 day old	84
13	Amount of lipid peroxidation product in plasma of broilers	85
14	Amount of superoxide dismutase activities in erythrocyte lysate of broilers	87
15	Amount of catalase activities in erythrocyte lysate of broilers	88
16	Amount of lymphocyte count from different groups	89
17	Amount of heterophil count from different groups	90
18	Amount of eosinophil count from different groups	91
19	Amount of basophil count from different groups	92

Table		Page
20	Amount of monocyte count from different groups	93
21	Amount of heterophil per lymphocyte ratio from different groups	94
22	Caecal lesion score of broilers from different groups	95
23	Microscopic examination score of caecal tissues of broilers from different group	106

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Life cycle of *Eimeria spp.* in chicken	16
2	The differential characteristics of poultry coccidiosis in the part of the intestine that is affected	18
3	Growth of culture *Lactobacillus acidophilus* in basal media with 2% glucose and selected local plants extracts	76
4	Growth of culture *Lactobacillus brevis* in basal media with 2% glucose and selected local plants extracts	77
5	Growth of culture *Lactobacillus fermentum* in basal media with 2% glucose and selected local plants extracts	78
6	High power view of caecal histopathology of broiler-infected *E. tenella* illustrating a normal lining of the epithelial of caeca at day 0	96
7	High power view of caecal histopathology of broiler-infected *E. tenella* illustrating the gametocyte stage and schizonts at day 3	97
8	High power view of caecal histopathology of broiler-infected *E. tenella* showing the rupture of schizonts and releasing the merozoites at day 6	98
9	High power view of caecal histopathology of broiler-infected *E. tenella* showing the rupture of oocysts and hemorrhaging at day 9	99
10	High power view of caecal histopathology of broiler-infected *E. tenella* showing the severe hemorrhaging which continued through	100

Figure		Page
	day 12	
11	High power view of caecal histopathology of broiler-synbiotic treated group showing the normal lining of the caecal epithelium at day 0	101
12	High power view of caecal histopathology of broiler-synbiotic treated group showing the gametocyte stage and schizonts at day 3	102
13	High power view of caecal histopathology of broiler-synbiotic treated showing the formation of oocysts at day 6	103
14	High power view of caecal histopathology of broiler-synbiotic treated showing the rupture of oocysts and some was hemorrhaging at day 9	104
15	High power view of caecal histopathology of broiler-synbiotic treated showing hemorrhaging that continued through day 12	105

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

ANT	Antibiotics
AGP	Antimicrobial growth promoter
BHI	Brain Heart Infusion
C.	Campylobacter
Ca	Calcium
Cat.	Catalase
CE	Competitive exclusion
CD	Crypt depth
CFU	Colony Forming Unit
Cl.	Clostridium
CP	Crude Protein
DEX	Dextrose
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DP	Degree of Polymerization
E.	*Eimeria*
E. coli	*Escherichia coli*
EU	European Union
F	fructosyl
FCR	Feed Conversion Ratio
FE	Feed Efficiency
FI	Feed Intake

Ft^2	Foot square
g.	gram
G	glucosyl
GI	Gastrointestinal
GIT	Gastrointestinal tract
H: L	Heterophil per Lymphocyte
Histopath.	Histopathology
IU	International unit
L.	Lactobacillus
LAB	Lactic Acid Bacteria
MDA	Malondialdehyde
mg	Milligram
MJ/kg	Megajoules per kilogram
ml	Milliliter
mmol/l	millimoles/liter
MRS	de Man Rogasa and Sharpe
NEC	Necrotizing enterocolitis
NDO	Non – digestible oligosaccharide
OF	Oligofructose
PCR	Polymerase Chain Reaction
RBC	Red blood cell
SOD	Superoxide dismutase
U/g Hb	Units / gram of Hemoglobin
VFA	Volatile fatty acid

VH	Villous height