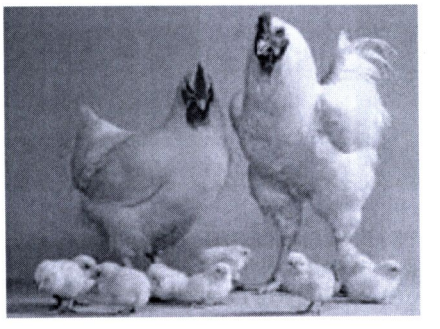
บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

2.1 ไก่เนื้อ

ไก่เนื้อหรือไก่กระทงนิยมเลี้ยงในประเทศไทยจำนวนมาก ตั้งแต่แบบเป็นฟาร์มขนาดเล็กจนถึงอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เนื้อขนาดใหญ่ พบว่ามีการเลี้ยงไก่เนื้อแทบทุกจังหวัดของประเทศ และจังหวัดที่มีการเลี้ยงไก่เนื้อมากที่สุด 5 อันดับแรก คือ จังหวัดชลบุรี ปราจีนบุรี ฉะเชิงเทรา นครนายก และระยอง (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2553)

2.1.1 ลักษณะโดยทั่วไปของไก่เนื้อ

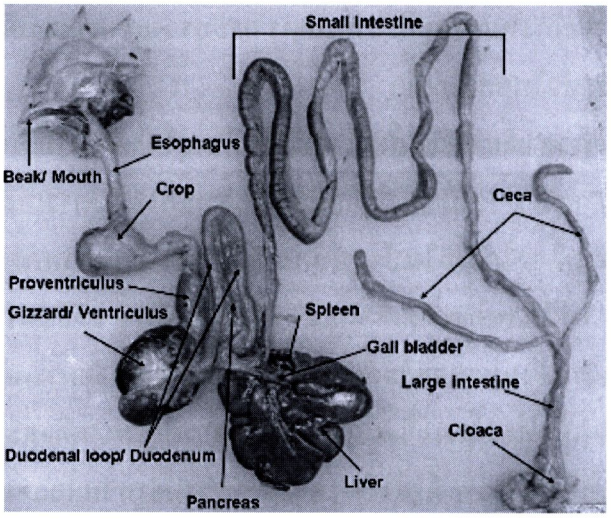
ไก่เนื้อเป็นไก่ที่ใช้เวลาเลี้ยงระยะสั้น โดยทั่วไปมีอายุโดยเฉลี่ยไม่เกิน 8 สัปดาห์ มีน้ำหนักประมาณ 2 กิโลกรัม (ภาพที่ 2-1) เป็นพันธุ์ไก่ที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูง เนื้อไก่นุ่ม ไม่เหนียว การเลี้ยงไก่เนื้อในปัจจุบันกลายเป็นระดับอุตสาหกรรม มีระบบการจัดการผลิตที่มีประสิทธิภาพ ไก่ที่ผ่านการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ จะมีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว กินอาหารน้อย และมีความต้านทานต่อโรคต่าง ๆ ได้ดี ทั้งยังมีปัจจัยการผลิตซึ่งประกอบขึ้นเป็นอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เนื้อที่สมบูรณ์ ได้แก่ อาหารไก่ต้องมีคุณภาพดีและตรงตามความต้องการของไก่ในแต่ละระยะ อุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการเลี้ยงไก่ควรมีจำนวนและขนาดที่เหมาะสมกับอายุและปริมาณของไก่ โรงเรือนและอุปกรณ์ อาหาร น้ำ ต้องมีความสะอาด หากปล่อยให้ชื้นแฉะจะทำให้เป็นแหล่งกำเนิดของโรคและแมลงได้ (ลิขิต, 2541)



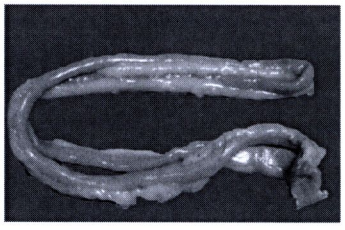
ภาพที่ 2-1 ไก่เนื้อ (กรมการค้าภายใน กระทรวงพาณิชย์, [ม.ป.พ.])

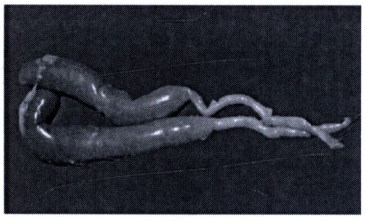
2.1.2 ทางเดินอาหารของไก่เนื้อ

ทางเดินอาหารของไก่เนื้ออาจแบ่งเป็น 6 ส่วน ได้แก่ Crop, Proventriculus (Gizzard), Duodenum, Jejunum, Ileum และ Colon (ภาพที่ 2-2 และ 2-3) ทางเดินอาหารของไก่เนื้อเป็นอวัยวะที่สำคัญ เพราะนอกจากเป็นบริเวณที่มีการย่อยอาหารเพื่อดูดซึมสารอาหารไปใช้ประโยชน์แล้ว ยังเป็นที่อยู่ของจุลินทรีย์ทั้งจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normal Microflora) และจุลินทรีย์ก่อโรค (Pathogen) ซึ่งมีทั้งแบคทีเรียก่อโรคประเภทแกรมบวกและแกรมลบ สภาวะในทางเดินอาหารมีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มหรือลดของจำนวนจุลินทรีย์ ตัวอย่างเช่น อุณหภูมิของร่างกาย และความชื้น โดยเฉพาะค่าความเป็นกรดด่างในทางเดินอาหาร (Dhawale, 2005) ความเป็นกรดด่างและเวลาในทางเดินอาหารของไก่เนื้อแสดงดังตารางที่ 2-1



ภาพที่ 2-2 ทางเดินอาหารของไก่เนื้อ (Poultry Production Manual, [n.d.])


(1) ไอเลี่ยม


(2) ซีกัม

ภาพที่ 2-3 ลักษณะของลำไส้ไก่ (วราภรณ์, 2550)

ตารางที่ 2-1 ค่าความเป็นกรดด่างในระบบทางเดินอาหารของไก่

Position		pH	Residence Time (min.)
	Sturkie	Farner	Dhawale
Crop	4.00-6.30	4.50	45
Proventriculus	3.17-4.80	4.40	70
Gizzard	2.50-4.47	2.60	
Duodenum	5.70-6.00	5.70-6.0	
Jejunum	5.80-5.90	5.80	
Ileum	6.30-6.40	6.30	160-200
Rectum or Colon	6.30-6.40	6.30	30-50
Cecum	5.70-8.40	5.70	
Cloaca	5.40-8.40	5.90	

ที่มา : Sturkie and Whittow (1976); Farner (1942 อ้างถึงใน Rahmani, et al., 2005); Dhawale (2005)

2.2 โรคที่พบในการเพาะเลี้ยงไก่เนื้อ

จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในไก่เนื้อที่พบบ่อย ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย รา และโปรโตซัว

2.2.1 ไวรัสก่อโรคที่พบในไก่เนื้อ

2.2.1.1 Paramyxovirus

Paramyxovirus type 1 เป็นไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคนิวคาสเซิล (Newcastle Disease) เป็นหนึ่งในโรคติดเชื้อที่สำคัญที่สุดของสัตว์ปีก และมีผลก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมสัตว์ปีกขนาดใหญ่ เนื่องจากไวรัสโรคนิวคาสเซิล เป็นไวรัสที่สามารถจะติดเชื้อในสัตว์ปีกได้มากกว่า 240 ชนิด เป็นโรคติดต่อได้โดยตรงผ่านอุจจาระที่ติดเชื้อ และสารคัดหลั่งจากจมูกปากและดวงตา หรือการติดเชื้อจากสถานที่ที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ เช่น การสูดดมไวรัส กลืนกิน หรือสัมผัส ส่วนอัตราการตาย และอาการ ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น สายพันธุ์ไวรัส ชนิดเจ้าบ้าน อายุของเจ้าบ้าน ความเครียดด้านสิ่งแวดล้อม และการติดเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น *Escherichia coli* หรือเชื้อไวรัส ที่มีผลต่อระบบหายใจและระบบภูมิคุ้มกัน ในสัตว์ปีกอาการทั่วไป ได้แก่ การผลิตไข่น้อยลง กระหายน้ำผิดปกติ กระสับกระส่าย และบวมของเนื้อเยื่อรอบดวงตา อาการระบบทางเดินหายใจ เช่น จาม หอบ และไอ ขณะที่อาการทางลำไส้ที่ชัดเจนคือ ท้องร่วงเป็นน้ำ

อาการประสาทอาจประกอบด้วยอัมพาตของปีกและ/หรือขา บิดจากศีรษะและลำคอ โรคไขสันหลังเสื่อม ชักเกร็งของขาและเกิดอัมพาตสมบูรณ์ ในกรณีเฉียบพลันจะทำให้เกิดความตายโดยฉับพลัน (Dortmans, 2011; จิโรจ, 2544)

2.2.1.2 Adenovirus

Adenovirus Type 1 ทำให้เกิดโรคต่างๆในไก่ ได้แก่ โรคติดเชื้ออะดีโนไวรัสของระบบหายใจอย่างอ่อน (Adenovirus Respiratory) โรคอินคลูชั่น บอดี้ เฮปปาไตติส (Inclusion Body Hepatitis) และโรคไฮโดรเพอริคาร์เดียม-เฮปปาไตติส ซินโดรม (Hydropericardium-Hepatitis Syndrome) สามารถแพร่โรคผ่านไข่ได้ ไก่ป่วยมีการขับถ่ายเชื้อโรคออกมากับอุจจาระไก่ และสามารถแพร่เชื้อให้ฝูงไก่ที่ไวต่อโรคโดยตรง ไก่ที่เกิดอาการป่วยด้วยโรคอินคลูชั่น บอดี้ เฮปปาไตติส ไก่จะมีอาการซึม ขนยุ่ง และยืนนิ่งอยู่กับที่ อัตราไก่ป่วยมีปานกลาง ประมาณ 5 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ พบอัตราการตายสูงขึ้นเล็กน้อยในไก่เนื้อและไก่ไข่ที่มีอายุ 2 ถึง 6 สัปดาห์ ถ้าพบร่วมกับไวรัสมากกว่า 1 ชนิด ที่ก่อให้เกิดปัญหาภูมิคุ้มกันโรคบกพร่อง อัตราป่วย และอัตราการตายสูงเกิน 10 เปอร์เซ็นต์ (จิโรจ, 2544)

2.2.1.3 Reoviruses

Reoviruses ทำให้เกิดโรคการดูดซึมอาหารบกพร่อง (Malabsorption Syndrome) ซึ่งอาจอาการเนื่องจากร่วมกับไวรัสชนิดอื่น หรือร่วมกับเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในลำไส้จากการทดลองบดลำไส้ของไก่ที่มีอาการ ป้อนให้ลูกไก่ปลอดโรคกิน พบว่าลูกไก่แสดงอาการแคะแกร็น แต่การให้เชื้อ Reoviruses ที่แยกได้จากไก่แคระแกร็น ป้อนให้ลูกไก่ปลอดโรคกิน พบว่าลูกไก่ไม่แสดงอาการ จึงสรุปได้ว่า กลุ่มอาการนี้มีสาเหตุหลายอย่างร่วมกัน ซึ่งอาการของไก่ที่ติดเชื้อนี้ทำให้อัตราการเจริญเติบโตช้าและอัตราการตายสูงขึ้น มักพบในฝูงไก่ที่มาจากแม่ไก่อายุน้อย โดยเชื้อนี้จะแพร่ผ่านไข่ได้ และแพร่เชื้อระหว่างไก่ในฝูงไก่เนื้อได้ อาจมีการติดเชื้อแบบแอบแฝงในไก่สาว และพบเชื้อในกระแสเลือดเมื่อไก่เริ่มไข่ (จิโรจ, 2544)

2.2.2 แบคทีเรียก่อโรคที่พบในไก่เนื้อ

2.2.2.1 *Escherichia coli*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ Non-acid-fast, Uniform Staining, ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในที่ ๆ มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน อาจมีได้หลากหลายขนาดและรูปร่าง สายพันธุ์ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้และมี Peritrichous Flagella ซึ่ง *Escherichia coli* เป็นจุลินทรีย์ที่มีอยู่ปกติในลำไส้สัตว์ปีกแต่บางสายพันธุ์ เช่น *Escherichia coli* (APEC) เป็นสาเหตุทำให้เกิด Colibacillosis ซึ่งเป็นโรคที่ร้ายแรงต่อระบบการทำงานของร่างกาย (Kabir, 2010) รวมทั้งการติดเชื้อในถุงไข่แดง (Yolk Sac) ของลูกไก่ การเกิดความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ เกิดโรคเยื่อกระเพาะอักเสบ (Peritonitis Layer) และโลหิตเป็นพิษ (Blood Poisoning) (Janmaat and Morton, 2010) โรค Avian Colibacillosis สามารถพบได้

ทุกช่วงอายุของไก่ (9.52 ถึง 36.73 เปอร์เซ็นต์) และนกที่โตเต็มวัยแล้ว (36.73 เปอร์เซ็นต์) (Rahman, et al., 2004) นอกจากนั้นยังพบ *Escherichia coli* O2 : K1 ซึ่งคัดแยกจากมนุษย์และไก่ (Achtman, et al., 1986) และสายพันธุ์ O78 จากมนุษย์, โค, แกะ, หมู และไก่ มีผลต่อการติดเชื้อของไก่ (Cherifi, et al., 1994)

จากการศึกษาการดื้อยาต้านจุลชีพทั้งในระดับเซลล์และระดับโมเลกุลของ *Escherichia coli* ในไก่เนื้อ ด้วยวิธี Disk Diffusion Test และ Polymerase Chain Reaction ไพเมอร์เฉพาะต่อยีน 10 ชนิดของ *Escherichia coli* ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง พบการดื้อยาต่อเตตราซัยคลิน แอมพิซิลลิน อิริโธรมัยซิน 100 เปอร์เซ็นต์ และยีน *tetA, ClTM, ereA* ดื้อยา 90, 93.3 และ 73.3 เปอร์เซ็นต์ ต่อเตตราซัยคลิน แอมพิซิลลิน และอิริโธรมัยซิน ตามลำดับ ในขณะที่พบการดื้อยาเซฟฟาโลธิน 73.3 เปอร์เซ็นต์, ซัลโฟนามายด์ และไตรเมธโธปริม 26.7 เปอร์เซ็นต์ (Mooljuntee, Chansiripornchai and Chansiripornchai, 2010)

2.2.2.2 *Salmonella*

เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างท่อน (Rod) ขนาดเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 ถึง 1.5 ไมโครเมตร ยาว 2 ถึง 5 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ติดสีแกรมลบ (Enterobacteria) ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ โดยใช้ Peritrichous Flagella หรือไม่เคลื่อนที่ พบในร่างกายของสัตว์เลือดอุ่นรวมทั้งมนุษย์ และบางครั้งในสัตว์เลื้อยคลาน พบบ่อยในอาหารที่สัตว์กิน (Williams and Wilkins, 1957) ดังนั้นการติดเชื้อ *Salmonella* มีความสำคัญเป็นทั้งสาเหตุของโรค Clinical Disease ในสัตว์ปีก และทำให้เกิดโรคต่อมนุษย์ที่บริโภคไก่ติดเชื้อเข้าไป มักพบปัญหาการติดเชื้อในลูกไก่ (14.55 เปอร์เซ็นต์) ไก่ที่กำลังเจริญเติบโต (16.10 เปอร์เซ็นต์) และไก่สาว (16.10 เปอร์เซ็นต์) (Rahman, et al., 2004) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดอาการไทฟอยด์ในสัตว์ปีกทั้งชนิดเฉียบพลันหรือเรื้อรังและเกิดโรค Pullorum จาก *Salmonella Pullorum* ซึ่งส่วนใหญ่มีอาการเฉียบพลันในไก่สาวที่มีอายุ 2 ถึง 3 สัปดาห์ ส่วนไก่ที่เจริญเต็มวัยมีโอกาสเป็นแบบเรื้อรัง (Kabir, 2010)

2.2.2.3 *Staphylococcus*

เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม (Cocci) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ถึง 1.5 ไมโครเมตร อยู่เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือกลุ่ม บางครั้งคล้ายพวงองุ่น ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ สร้างสารพิษได้หลายชนิดทั้ง Exotoxin และ Endotoxin (Burahanan, et al., 1974) *Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและจัดเป็นเชื้อฉวยโอกาสในสัตว์ปีกโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตร้อน ก่อให้เกิดโรคกับสัตว์ปีกหลายชนิด อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อนี้อาจแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ อาการชนิดเรื้อรัง เช่น โรคผิวหนังอักเสบ และอาการชนิดเฉียบพลัน (Barger, Card and Pomeroy, 1958) อาการชนิดเรื้อรังที่พบในไก่ ได้แก่ เท้าบวมเป็นหนอง ติดเชื้อบริเวณเยื่อหุ้มข้อ และโรคผิวหนังบริเวณหงอนและเหนียง การติดเชื้อเหล่านี้อาจรักษาด้วยยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมโดยผสมในอาหาร

ไก่เนื้อที่ติดเชื้อควรถูกแยกออก และทำลาย สถานที่เพาะเลี้ยงควรได้รับการฆ่าเชื้อ (Janmaat and Morton, 2010)

ตัวอย่างการพบ *Staphylococcus aureus* ในซากไก่ตาย เช่น รายงานการสำรวจเชื้อจากซากไก่ตายโดยไม่มีประวัติอาการเด่นชัดจากฟาร์มหลายแห่งในภาคกลางของประเทศไทย เมื่อนำมาผ่าแยกเชื้อ *Staphylococcus aureus* จาก หัวใจ ปอด ตับ และม้าม พบเชื้อนี้ 120 ตัวจากซากไก่ 200 ตัว โดยพบในไก่เนื้อและไก่ไข่ประมาณ 55.65 และ 65.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อทดสอบความไวของเชื้อต่อสารปฏิชีวนะ พบสารปฏิชีนะ Kanamycin และ Neomycin มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการทำลายเชื้อ ประสิทธิภาพพอใช้ ได้แก่ Chloromycetin, Penicillin, Erythromycin และ Nouobiocin ตามลำดับ และเชื้อนี้สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ Streptomycin และ Tetramycline ได้มาก (สาวิตรี และดำรง, 2521)

2.2.2.4 *Clostidium*

เป็นแบคทีเรียรูปท่อน (Rod) แกรมบวก เคลื่อนที่โดยใช้ Peritrichous Flagella บางสายพันธุ์อาจไม่เคลื่อนที่ บางสายพันธุ์สามารถแสดงกิจกรรม Saccharolytic และ Fermentative ผลิตกรดต่าง ๆ (บิวทีริก และ อะซิติก), ก๊าซ (คาร์บอนไดซ์ออกไซ, ไฮโดรเจน และมีเทน) และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น แอลกอฮอล์ และอะซีโตน บางสายพันธุ์อื่น ๆ แสดงกิจกรรม Proteolytic ทำให้โปรตีนเสียสภาพเน่าเสีย เจริญในสภาวะไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic) บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในที่มีอุณหภูมิสูง และสามารถสร้างสารพิษออกภายนอกเซลล์ (Exotoxin) พบปกติในดิน ลำไส้ของมนุษย์ และสัตว์ สายพันธุ์ที่พบบ่อย และสามารถสร้างสารพิษได้ คือ *Clostridium botulinum, Clostridium pasteurianum* และ *Clostridium perfringens* (Williams and Wilkins, 1957)

Clostridium Perfinger เป็นสาเหตุของโรคลำไส้อักเสบแบบเนื้อตาย มีรายงานการพบเชื้อนี้ในไก่ เช่น *Clostridium Perfringens* type A เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค Poultry Necrotic Enteritis ทำให้ไก่ตาย เนื่องจากเชื้อนี้สามารถผลิต Alpha Toxin (CPA) ในลำไส้ไก่และทำลายระบบภูมิคุ้มกันในไก่ (Abildgaard, et al., 2010; Coursodon, et al., 2010; จิโรจ, 2544)

2.2.2.5 *Campylobacter*

Campylobacter มีรูปร่างลักษณะเป็นท่อนโค้ง ติดแกรมลบ แต่การติดสีจะจางมากแทบมองไม่เห็น ดังนั้นต้องย้อมด้วย Safranin นานกว่าปกติ 2 ถึง 3 นาที จึงจะเห็นรูปร่างเซลล์ได้ ขนาดของเซลล์จะมีลักษณะผอมบางกว่าเซลล์ทั่วไป มีขนาดกว้าง 0.2 ถึง 0.5 ไมโครเมตร ยาว 0.5 ถึง 5 ไมโครเมตร เซลล์เรียงเป็นสองเซลล์ สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วย Polar Flagellum ที่ขั้ว โดยพบเพียง 1 เส้น (Morris, et al. อ้างถึงใน จริยา และสุวนี, 2539) *Campylobacter* เพียง 500 เซลล์ก็สามารถทำให้เกิดอาการของโรคได้ โดยเชื้อจะสามารถเข้าไปอยู่ใน Epithelial Cell ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ถ้าร่างกายไม่สามารถกำจัดเชื้อออกได้จะทำให้เกิดโรคลำไส้อักเสบ *(Campylobacter* Enteritis) จาก

การที่ไก่เป็นแหล่งสำคัญของโรคดังกล่าว จึงมีการวิจัยเพื่อลดปัญหาของการติดเชื้อ *Campylobacter Jejuni* ในไก่ โดยสร้างภูมิคุ้มกันด้วยการฉีดวัคซีนเชื้อตายที่เรียกว่า Killed *Campylobacter Jejuni* Vaccine ให้กับไก่ในระยะที่ฟักเป็นตัว จากผลการทดลองพบว่าเมื่อสร้างภูมิคุ้มกันแล้วทำให้จำนวนเชื้อที่ตรวจในขี้ไก่ลดลงไป 2 เปอร์เซ็นต์ (Widder, et al., 1996 อ้างถึงใน จริยา และสุวนี, 2539)

2.2.3 ราและโปรโตซัวก่อโรคที่พบในการเพาะเลี้ยงไก่เนื้อ

2.2.3.1 *Aspergillus fumigatus*

เป็นราที่ก่อให้เกิดโรค Aspergillosis ที่พบมากที่สุดในไก่เนื้อ ซึ่งทำให้เกิดโรคปอดอักเสบหรือลำไส้อักเสบในทุกกลุ่มอายุโดยเฉพาะอย่างยิ่งในที่ที่มีการติดเชื้ออื่น ๆ อยู่แล้ว ไก่ที่ติดเชื้อควรได้รับการทางการกำจัดและเผาทั้งครอก และพ่นฆ่าเชื้อราด้วยคอปเปอร์ซัลเฟต 1 เปอร์เซ็นต์ (Janmaat and Morton, 2010)

2.2.3.2 *Candida* Albicans

เป็นราที่ก่อให้เกิดโรค Candidiasis หรือ Thrush เป็นอีกหนึ่งชนิดของเชื้อราที่พบบ่อยในสิ่งแวดล้อม และพบในไก่สาว เกิดการติดเชื้อที่ปาก และ Crop ทำให้เหม็นเปรี้ยว นอกจากนี้ยังอาจทำให้เกิดอาการท้องร่วง ผลขั้นต้นจะทำให้ไก่เครียด เนื่องจากสภาพสกปรก ความหนาแน่น การใช้ Nystatin เป็นการควบคุมที่มีประสิทธิภาพ (Janmaat and Morton, 2010)

2.2.3.3 *Coccidia*

เป็นสายพันธุ์โปรโตซัวที่ก่อให้เกิดโรค Coccidiosis ซึ่งเปนโรคบิด เป็นหนึ่งในโรคที่พบมากที่สุดของสัตว์ปีก เช่น ไก่ เป็ด และห่าน อย่างไรก็ตาม *Coccidia* มีความจำเพาะต่อเจ้าบ้าน (Host-specific) ดังนั้นไก่จะไม่ได้รับผลกระทบจาก *Coccidia* ที่ติดเชื้อในเป็ด โรคนี้มักเกิดกับไก่ที่มีอายุมากกว่า 3 สัปดาห์ อาการทั่วไปที่พบ เช่น ขนยุ่ง ปีกตก หงอนซีด และท้องเสีย บางครั้งมีเลือด การสูญเสียส่วนใหญ่เกิดขึ้นในไก่เล็ก วงจรชีวิตของ *Coccidia* มักอาศัยอยู่ในลำไส้หรือ Caecum ของไก่และผ่านออกมาทางอุจจาระ ทำให้ติดเชื้อในสภาพแวดล้อมบริเวณที่ชื้นและมีการแพร่กระจายจากไก่สู่ไก่ การจัดการที่ดีจะช่วยป้องกันการแพร่ระบาดอย่างรุนแรงของโรคบิด เมื่อพบโรคมักต้องใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น Coccidiostat ผสมในอาหารเพื่อป้องกันการระบาดของโรคบิด (Janmaat and Morton, 2010)

2.2.3.4 *Histomonas Meleagridis*

เป็นโปรโตซัว ที่ก่อให้เกิดโรค Blackhead ทั้งไก่และไก่งวง แต่ไก่งวงจะมีความไวต่อการติดเชื้อมากกว่า ซึ่ง *Histomonads* ส่วนใหญ่อาศัยอยู่ใน Caecum (Blind Gut) และเนื้อเยื่อบริเวณนั้น อาการที่พบได้แก่ หงอนเหี่ยว เหนียงมีสีเหลือง และท้องเสีย (Janmaat and Morton, 2010)

2.3 โปรไบโอติก (Probiotic)

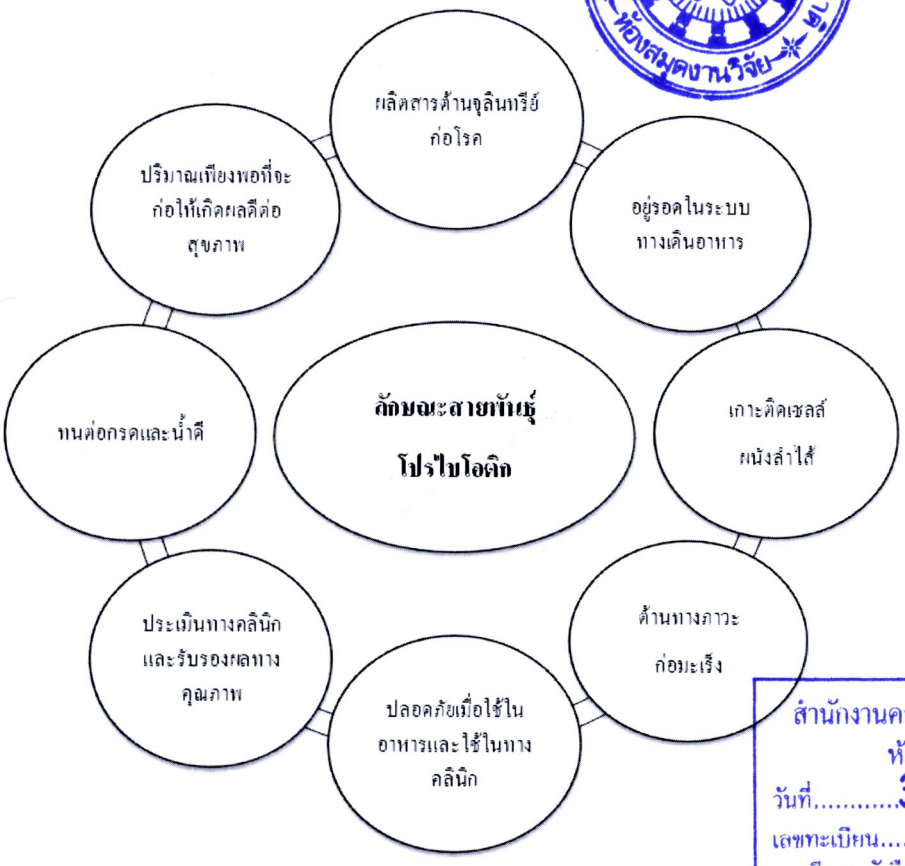
คำว่า โปรไบโอติก (Probiotic) ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกในรายงานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของ Lilly and Stillwell ในปี ค.ศ. 1965 เพื่อกล่าวถึงสารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมา และช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ในปี ค.ศ. 1974 Parker ได้ให้ความจำกัดความว่า โปรไบโอติก คือ สิ่งมีชีวิตและสารเคมีที่มีผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ในปี ค.ศ. 1989 Fuller ได้ให้ความจำกัด ความว่า โปรไบโอติก คือ อาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต สามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย (มีชัย, 2554)

อย่างไรก็ตามในปี ค.ศ. 1989 สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาประเทศสหรัฐอเมริกา (The United States Food and Drug Administration; FDA) ได้ให้คำจำกัดความว่า สารเสริมชีวนะเป็นผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ซึ่งเป็นอาหารที่ให้กินโดยตรง และจัดเป็น Generally Recognized As Safe (GRAS) Ingredients ซึ่งเป็นอาหารและสารที่เติมในอาหารที่ปลอดภัยสามารถใช้เป็นอาหารมนุษย์ได้ โดยผ่านการพิจารณาจากเภสัชกรและนักพิษวิทยา (คนึงนิจ, 2540)

2.3.1 เกณฑ์ในการคัดเลือกโปรไบโอติก

โดยทั่วไป การคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่จะนำมาใช้กับคนและสัตว์นั้น มีแนวทางหลัก ๆ คือ 1) สามารถอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์หรือสัตว์นั้น ๆ ได้ 2) ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรค 3) สามารถเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารได้ 4) มีปริมาณสูงเพียงพอที่จะทำให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ (ประมาณ 10^7 ถึง 10^9 cfu/ml ของผลิตภัณฑ์) และสิ่งที่ต้องมุ่งเน้นที่สำคัญคือ เรื่องความปลอดภัย หลักเกณฑ์ของการคัดเลือกโปรไบโอติกตามหลักทฤษฎีเบื้องต้น และลักษณะที่เหมาะสมที่จะนำโปรไบโอติกไปใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหารได้ดังรายละเอียดดังภาพที่ 2-4 (ไชยวัฒน์, 2554) อย่างไรก็ตามการคัดเลือกโปรไบโอติกขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้งาน และความเหมาะสมกับชนิดของผู้บริโภคโปรไบโอติกนั้น ๆ ด้วย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 30 พ.ย. 2555
เลขทะเบียน 250792
เลขเรียกหนังสือ

ภาพที่ 2-4 คุณลักษณะเบื้องต้นของโปรไบโอติกเพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกตามทฤษฎีเบื้องต้นในการคัดเลือก (ไชยวัฒน์, 2554)

2.3.2 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก

สารเสริมชีวนะหรือโปรไบโอติกก่อให้เกิดประโยชน์กับสัตว์หลายด้าน การใช้โปรไบโอติกเป็นไปตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539 โดยมีระดับการใช้ในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปเพื่อขายได้ในอัตราส่วน ไม่น้อยกว่า 1 x 10^5 cfu (Colony Forming Unit) ต่ออาหารสัตว์ 1 กรัม จุลินทรีย์ที่กำหนดให้ใช้เป็นโปรไบโอติกตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539 (สำนักงานคณะกรรมการกฤษฎีกา, 2539) มีดังนี้

2.3.2.1 แบคทีเรีย

Lactobacillus Plantarum, Lactobacillus Casei, Lactobacillus Fermentum, Lactobacillus Brevis, Lactobacillus Bulgaricus, Lactobacillus Acidophilus, Lactobacillus Cellobiosus, Lactobacillus Curvatus, Lactobacillus Delbruekii, Lactobacillus Lactis, Lactobacillus Reuterii, Lactobacillus Helveticus, Leuconostoc Mesenteroides, Streptococcus Faecium Cernelle, Streptococcus Thermophilus, Streptococcus Faecium, Streptococcus Cremoris, Streptococcus Diacetylactis, Streptococcus Lactis, Streptococcus Intermedius, Baciluss Subtilis Strain BN,

Bacillus Coagulan, Bacillus Lentus, Bacillus Lichenifermis, Bacillus Pumilus, Bacillus Subtilis (สเตรนที่ไม่สร้างยาปฏิชีวนะ), *Bacillus Toyoi, Bacteroides Amylophilus, Bacteroides Capillosus, Bacteroides Ruminocola, Bacteroides Suis, Bifidobacterium Adolescentis, Bifidobacterium Animalis, Bifidobacterium Bifidum, Bifidobacterium Infantis, Bifidobacterium Longum, Bifidobacterium Thermophilum, Pediococcus Acidilacticii, Pediococcus Cerevisiae, Pediococcus Pentosaceus, Propionibacterium Freudenreichii, Propionibacterium Shermanii*

2.3.2.2 รา

Aspergillus Niger, Aspergillus Oryzae, Pediocuceus sp., Candida Pintolepessi, Sacchalomyces Cerevisiae

2.3.3 ประโยชน์ของโปรไบโอติก

2.3.3.1 แย่งจับบริเวณผนังทางเดินอาหาร ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถจับได้และถูกขับออกจากระบบทางเดินอาหารในที่สุด ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถยึดจับกับ Epitirial Cells ของผนังลำไส้ได้ด้วยกลไกหลายรูปแบบ เช่น ใช้แรง Electrostatic Interactions, Hydrophobic, Steric Forces หรือการผลิต Lipoteichoic Acids หรืออาจมีโครงสร้างพิเศษที่เรียกว่า External Appendages ที่มีสารจำพวก Lectins เคลือบอยู่ที่ผิวด้านนอก (Servin and Coconnier, 2003)

2.3.3.2 สร้างสารยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค โดยโปรไบโอติกหลายชนิดสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น กรดอินทรีย์และสารเมตาโบไลซ์ที่มีโมเลกุลต่ำได้แก่ Lactic Acid, Acetic Acid, Hydrogen Peroxide (H_2O_2), Carbon Dioxide (CO_2), Diacetyl, รูเทอริน และแบคเทอริโอซิน

ก) กรดอินทรีย์ (Organic Acid)

กรดอินทรีย์ที่สร้างโดยโปรไบโอติก เช่น กรดแลคติก และกรดอะซิติก มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ทนกรด เช่น *Escherichia Coli, Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. เนื่องจากการลดลงของค่ากรดด่าง และการสะสมของกรดอินทรีย์ จุลินทรีย์มีเยื่อหุ้มเซลล์จะทำหน้าที่คัดเลือกสารเข้าออกภายในเซลล์ และไม่ยอมให้สารที่มีประจุผ่านเข้าเซลล์ได้ เพื่อรักษาสภาพความเป็นกลางภายในเซลล์ กรดอินทรีย์เป็นกรดไขมันที่ระเหยได้ (Volatile Fatty Acid; VFA) มีโมเลกุลขนาดเล็กน้ำหนักน้อยกว่า 700 ดาลตัน จึงสามารถซึมผ่านผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคได้ดี กรดอินทรีย์อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย และเกิดการแตกตัวให้ประจุบวก (H^+) และประจุลบ ($RCOO^-$) ภายในเซลล์ ประจุบวกทำให้ความเป็นกรดภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้นและเกิดการสะสมของกรด ซึ่งขัดขวางกระบวนการเมแทบอลิซึมในการสังเคราะห์สารต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น RNA DNA และโปรตีน รวมทั้งการขนส่งสารต่าง ๆ ในเซลล์ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ ทำให้เชื้อก่อโรคที่ฉวยโอกาสตายลง หรือไม่สามารถ

เจริญเติบโตได้ โดยหลังจากที่กรดอินทรีย์แตกตัวให้ประจุบวกและประจุลบ แบคทีเรียพยายามที่ขับกรดที่แตกตัวนี้ออก แต่ขับออกได้เฉพาะประจุบวก ในขณะที่ประจุลบจะมีการขับออกได้น้อยมาก ทำให้มีการสะสมอยู่ภายในเซลล์สูง ประจุลบเหล่านี้เป็นพิษต่อระบบการสังเคราะห์โปรตีน RNA และ DNA ภายในเซลล์ การขับประจุบวกออกจากเซลล์แบคทีเรียต้องอาศัยพลังงานภายในเซลล์ (ATP) เข้าช่วย ทำให้เซลล์สูญเสียพลังงานมาก ไม่เพียงพอที่จะนำไปใช้ในกระบวนการอื่น ๆ เช่น การเจริญเติบโต หรือการสืบพันธุ์ และหากต้องขับกรดออกมามาก ๆ เซลล์จะสูญเสียพลังงานจนหมดและตายได้ นอกจากนั้นสภาวะที่เป็นกรดภายในลำไส้ยังช่วยทำให้เอนไซม์ และน้ำย่อยต่าง ๆ ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งเป็นผลดีต่อจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เป็นเชื้อประจำถิ่นภายในลำไส้อยู่แล้ว ส่งผลให้อัตราการย่อยและการดูดซึมอาหารเพิ่มขึ้น ทำให้สัตว์เจริญเติบโตได้ดีขึ้น (รจเรข, 2546)

ข) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ (Hydrogen Peroxide : H_2O_2)

โดยทั่วไปแล้วในสิ่งมีชีวิตไม่มีการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกสลายโดยเอนไซม์ Peroxidases, Pseudocatalase และ Flavoproteins การที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถทำลายแบคทีเรียชนิดอื่นได้ เนื่องจากเป็นตัวออกซิไดส์ที่รุนแรงต่อเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจะออกซิไดส์ส่วนประกอบของเซลล์ที่มีหมู่ Sulfhydryl ได้แก่ โปรตีนในเซลล์ และไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ปฏิกิริยาการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะมีการขับออกซิเจนออก ทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนส่งผลให้แบคทีเรียชนิดอื่นไม่สามารถเจริญได้ (Fontaine, Claydon and Taylor-Robinson, 1996)

ค) คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon Dioxide : CO_2)

คาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนใหญ่เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซสแบบ Heterofermentative มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียสองแบบ คือ ทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจน และทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์โดยคาร์บอนไดออกไซด์จะไปยับยั้งระบบเอนไซม์ของกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน (Decarboxylation) และมีการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นไขมัน เป็นเหตุให้เกิดการสูญเสียสมบัติในการซึมผ่านของสารบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำสามารถกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้ แต่ความเข้มข้นสูงจะช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ (Ouwehand and Vesterlund, 2004)

ง) ไดอะซิติล (Diacetyl)

ไดอะซิติลเป็นผลิตผลสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึม ในการใช้น้ำตาลเฮกโซสของแบคทีเรีย เช่น *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Streptococcus* สามารถสังเคราะห์ไดอะซิติลได้ คุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และราได้ มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก

ไดอะซิติลมีประสิทธิภาพมากที่ค่ากรดด่างน้อยกว่า 7.0 ไดอะซิติลจะทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่จับกับอาร์จินีน (Arginine) ของแบคทีเรียแกรมลบ (Ouwehand and Vesterlund, 2004)

จ) แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซิน เป็นสารประเภทโปรตีน หรือโปรตีนเชิงซ้อนพวกลิโพโปรตีน (Lipoprotein) หรือไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) สร้างขึ้นได้จากทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ แสดงกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก และสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอริโอซิน แบคเทอริโอซินที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นเป็นสารจากธรรมชาติที่มีความปลอดภัย และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ อาทิเช่น *Bacillus cereus, Enterococcus, Clostridium botulinum, Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น (Tagg, Dajani and Wannamaker, 1976; Soomro, Masud and Anwaar, 2002) แบคเทอริโอซินที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นได้แก่ Nisin, Lacticin 3147, Lacticin 481, Lactococcin A, Lactocin 27, Sakacin A, Plantaricin C, Pediocin A และ Enterocin A เป็นต้น สมบัติของแบคเทอริโอซินจะพิจารณาจากขนาด ความคงตัว ตำแหน่งทางพันธุกรรม การดัดแปลงหลังผ่านกระบวนการแปลรหัสทางพันธุกรรม (Post-translation Modification) และกลไกการทำงานของสารแบคเทอริโอซินซึ่งมีความแตกต่างกัน แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ มีประจุบวก มักเสถียรที่สภาวะเป็นกรดหรือเป็นกลางแบคเทอริโอซินจะถูกทำลายเมื่อเก็บไว้ที่ค่ากรดด่างสูงกว่า 10 (Ozlem, 2003)

สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน แบคเทอริโอซินจะทำให้เกิดรูใน Cytoplasmic Membrane ของเซลล์ ทำให้เกิดการรั่วของสารต่าง ๆ ภายในเซลล์ และสูญเสียแรงขับเคลื่อนของโปรตอน (Proton Motive Force) แบคเทอริโอซินเป็นโมเลกุลที่มีประจุบวกที่มีส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับกลุ่มฟอสเฟต (Phosphate Groups) บนเมมเบรนของเซลล์เป้าหมาย โดยส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะแทรกเข้าไปในเมมเบรนทำให้เกิดเป็นรู และเข้าไปทำปฏิกิริยากับเป้าหมาย เช่น DNA RNA เอนไซม์ และตำแหน่งอื่น ๆ เพื่อฆ่าเซลล์เป้าหมาย (Bruno, Kaiser and Montville, 1992; Chikindas, et al., 1993; Cleveland, et al., 2001) แบคเทอริโอซินไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบมี Outer Membrane ทำหน้าที่ป้องกัน Cytoplasmic Membrane และชั้นเพปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan) ของแบคทีเรียแกรมลบ Outer Membrane แบ่งออกเป็นชั้นในและชั้นนอก ชั้นในประกอบด้วย Glycerophospholipids โดยชั้นนอกเป็น Lipopolysaccharide ที่ประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นไขมัน และComplex Heteropolysaccharide ซึ่งลักษณะบางส่วนเป็นประจุลบ จึงเกิดการจับกันแน่นและมีสมบัติเป็น Hydrophillic ดังนั้น Outer Membrane จึงทำหน้าที่ป้องกันสารที่มีสมบัติเป็น

Hydrophobic และโมเลกุลขนาดใหญ่ มีผลทำให้แบคเทอริโอซินซึ่งมีสมบัติเป็น Hydrophobic ไม่สามารถผ่าน Outer Membrane เข้าไปทำปฏิกิริยาที่บริเวณเป้าหมายได้ (Helander and Mattila-Sandholm, 2000)

นอกจากนั้น สุรศักดิ์ (2548) กล่าวว่า การทำงานของแบคเทอริโอซิน (Antibacterial Activity) ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้นั้นเป็นผลมาจากลักษณะการทำงานดังนี้ 1) ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ความสามารถในการยอมให้ผ่านเข้า-ออก (Permeability) ของเยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพไป เกิดภาวะเสียสมดุลขึ้นภายในเซลล์ 2) ทำให้เอนไซม์ที่สำคัญบางชนิดเสียคุณสมบัติไป 3) ทำให้สารพันธุกรรมเสียรูปร่างหรือหน้าที่ไปจากเดิม ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินในแต่ละกลุ่มจะมีกลไกการออกฤทธิ์ต่อเซลล์เป้าหมายที่แตกต่างกัน แต่ก็มีกลไกการออกฤทธิ์ที่คล้ายกัน แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนที่ 1 แบคเทอริโอซินจะยึดเกาะกับผิวของเซลล์เป้าหมาย และ ขั้นตอนที่ 2 แบคเทอริโอซินจะสร้างรู (Pore) ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์

Lactobacillus plantarum F1 และ*Lactobacillus brevis* OG1 ที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์หมักในประเทศไนจีเรีย สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน แสดงการยับยั้งทั้งแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย แสดงกิจกรรมการยับยั้ง 6400 และ3200 AU/ml ตามลำดับ ในการต้าน *Escherichia coli* NCTC10418 และ*Enterococcus faecalis* EF1, *Candida albicans* ATCC10231 และ*Klebsiella* sp. UCH15 ซึ่งแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus brevis* OG1 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ในขณะที่ *Lactobacillus plantarum* F1 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Ogunbanwo, Sanni and Onilud, 2003)

2.3.3.3 กระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยทั่วไประบบลำไส้นั้นรวมส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อ Lymphoid ซึ่งอาจเป็นบริเวณที่มีการยึดจับของโปรไบโอติก การยึดจับของโปรไบโอติกทำให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง ซึ่งผลของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันขึ้นอยู่กับชนิดของโปรไบโอติกและชนิดของเจ้าบ้าน ตัวอย่างเช่นการใช้ *Bacillus subtilis* E20 ผสมอาหารในกุ้ง (*Litopenaeus vannamei*) พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ Phenoloxidase Activity, Phagocytic Activity และ Clearance (Tseng, et al., 2009) และการใช้ *Bacillus cereus* var. toyoi ที่แยกได้จากน้ำหมักถั่วเหลืองเป็นโปรไบโอติกในสุกร พบว่าเซลล์ CD 8 + T cell มีจำนวนเพิ่มขึ้นในสุกรกลุ่มที่มีการเติมโปรไบโอติก (Scharelx, et al., 2007)

2.3.3.4 สร้างเอนไซม์ช่วยย่อยและส่งเสริมการเติบโต โปรไบโอติกที่แยกได้มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ช่วยย่อยได้แตกต่างกันขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกได้

ก) ตัวอย่างจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ผลิตเอนไซม์ช่วยย่อย

อะไมเลส

Rincker, Carter and Gilliland (2000) รายงานการคัดเลือก *Lactibacillus* ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส พบว่า สายพันธุ์ *Lactobacillus fermentum* L9, *Lactobacillus acidophilus* A-4 และ *Lactobacillus cidophilus* L23 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ โดยที่ *Lactobacillus acidophilus* L23 สามารถผลิตเอนไซม์ในปริมาณสูงเมื่อทดสอบโดยการย่อยแป้งข้าวโพด สำหรับ *Bacillus* รายงานของ Sreekumar and Soundarajan (2010) พบว่า *Bacillus subtilis* SK09 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ส่วน *Bacillus amyloliquefaciens* KA 63 สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยย่อยแป้งมันสำปะหลัง และกากถั่วเหลือง (พิเชฐ, 2528)

โปรติเอส

Lactobacillus paracacei สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสในการย่อย Ceasein แสดงกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 1.26 ถึง 5.80 U/ml (Haq and Mukhtar, 2006) บุปผา และคณะ (2527) พบว่า *Bacillus subtilis* (T1STR 25) และ*Bacillus licheniformis* (TISTR 18) สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสในปริมาณสูง

ไลเปส

Lactobacillus sp., *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ โดยพบว่า *Lactobacillus* sp. แสดงกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด (32 U/ml) และเอนไซม์นี้มีความคงทนต่ออุณหภูมิช่วง 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส และค่ากรดด่าง 8 ถึง 9 ซึ่งเหมาะแก่การนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Padmapriya, et al., 2010)

Bacillus subtilis สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ ในอาหารที่ประกอบด้วยสารสกัดยีสต์ แอมโมเนียมไนเตรท และน้ำมันละหุ่ง (ทวีพร, 2539) ส่วน *Bacillus megaterium* AKG-1 ที่คัดแยกจากดินสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนความร้อน แสดงกิจกรรมสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนโดยแสดงกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด (1160 unit/ml) รองลงมาคือการใช้รำข้าวสาลีแสดงกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 1000 unit/ml และใช้ Mannitol 0.2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน (848 unit/ml) ตามลำดับ (Sekhon, et al., 2006)

เซลลูเลส

Enterococcus faecium เป็นโปรไบโอติกใช้ผสมในอาหารและน้ำดื่มให้ไก่ พบว่าสัปดาห์แรกนอกจากเชื้อก่อโรค *Escherichia coli* จะลดลงแล้ว แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacilli* ยังเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นยังพบว่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมในช่วง 3 สัปดาห์แรก (Kacaniova, Kmet and Cubon, 2006)

Bacillus subtilis ที่คัดแยกได้จากดินสามารถสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ ด้วยวิธี Carboxymethyl Cellulose Clearing Assay พบว่าสายพันธุ์ No.4 วัด Exo-Glucanase Activity ได้ สูงสุด 20.55 mIU/ml และEndo-Glucanase ได้สูงสุด 30.91 mIU/ml (ธิปชัย, 2546)

ข) การใช้เชื้อโปรไบโอติกที่ผลิตเอนไซม์ช่วยย่อยในสัตว์

Essa, et al. (2010) ศึกษาการใช้ *Bacillus subtilis* NIOFSD017 (10^7 cfu/g), *Lactobacillus plantarum* NIOFSD018, *Bacillus subtilis* NIOFSD017 ผสม *Lactobacillus. plantarum* NIOFSD018 (10^7 cfu/g) และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* NIOFSD019 (10^4 cfu/g) พบว่า โปรไบโอติกทุกกลุ่มเพิ่มการเจริญในปลานิล ซึ่งการใช้ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นโปรไบโอติก สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปสในระบบทางเดินอาหารของปลาได้

การศึกษาการใช้ *Lactobacillus acidophilus* ในไก่ พบว่า การใช้ *Lactobacillus acidophilus* เพียงสายพันธุ์เดียวหรือการผสมทั้ง 12 สายพันธุ์ ของ *Lactobacillus* ทำให้เพิ่มระดับของเอนไซม์อะไมเลสอย่างมีนัยสำคัญในลำไส้เล็กของไก่ แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ Proteolytic และ Lipolytic ในลำไส้ไก่ นอกจากนี้การใช้ *Lactobacillus acidophilus* เป็นโปรไบโอติกมีผลทำให้น้ำหนักไก่เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุม (Jin, et al., 2000)

การศึกษา *Lactibacillus* ที่คัดแยกได้จากสุกร ได้แก่ สายพันธุ์ *Lactobacillus fermentum* L9, *Lactobacillus acidophilus* A-4 and *Lactobacillus acidophilus* L23 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ โดยที่ L23 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ในปริมาณสูงโดยสามารถย่อยแป้งข้าวโพด ซึ่งเป็นส่วนผสมของอาหารสุกร นอกจากนี้การใช้ *Lactobacillus acidophilus* L23 ผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงสุกรที่มีน้ำหนัก 6.5 กิโลกรัม โดยผสมใน Nonfat Milk จนได้ปริมาณเซลล์ 3 x 10^8 cell และ 3 x 10^8 cell ให้สุกรเป็นเวลามากกว่า 5 สัปดาห์ สามารถปรับปรุงการเจริญเติบโตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Rincker, Carter and Gilliland, 2000)

จากการศึกษา *Bacillus coagulans* NJ0516 เพื่อเป็นโปรไบโอติกในไก่เนื้อ พบว่าไก่เนื้อที่ได้รับสารอาหารที่มีโปรไบโอติกติดต่อกันเป็นเวลา 49 วัน แสดงการเจริญเติบโตที่ดีกว่าเมื่อพิจารณาจากน้ำหนักสุดท้ายและน้ำหนักซาก (Daily Weight Gain) และพบกิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอสและอะไมเลสมากกว่าในตัวควบคุม (Wang and Gu, 2010) เช่นเดียวกันกับการใช้ *Bacillus coagulans* SC8168 เป็นโปรไบโอติกในตัวอ่อนกุ้ง *Penaeus vannamei* พบกิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอส อะไมเลสและไลเปสสูงกว่าในตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (Zhou, Wang and Li, 2009)

2.4 การศึกษาโปรไบโอติกสำหรับไก่เนื้อ

จุลินทรีย์ที่มีการศึกษาเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงไก่เนื้อ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus*, *Bacillus, Enterococus Rumen* bacterium, *Pediococus* และ*Saccharomyces* ตัวอย่างการศึกษาจุลินทรีย์เป็นโปรไบโอติกในไก่ ได้แก่

2.4.1 การศึกษาจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ใช่ *Bacillus* เป็นโปรไบโอติกในไก่เนื้อ

การศึกษาแบคทีเรียแลคติก 4 สายพันธุ์ ของวราภรณ์ (2550) พบว่ามีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่ดี โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร เช่น *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. ได้ดี เมื่อทำการจำแนกสายพันธุ์พบว่า เป็นสายพันธุ์ *Enterococus faecium*, Rumen bacterium และ *Lactobacillus plantarum* 2 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถทนความเป็นกรดด่าง และน้ำดีในระดับที่พบในลำไส้ไก่ได้ อุณหภูมิที่เจริญและผลิตกรดได้ดีที่สุดคือที่ 30 องศาเซลเซียส ในช่วง 1.2 ถึง 2.1 เปอร์เซ็นต์ และต่ำลงที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นได้นำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ไปเสริมในอาหารไก่เนื้อ พบว่า โปรไบโอติกมีอิทธิพลต่อจำนวน *Escherichia coli* และแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ไก่เนื้อทั้งส่วน Ileum และ Cecum ในไก่ที่เสริมด้วยโปรไบโอติก ทั้งโปรไบโอติกทางการค้า โปรไบโอติกในรูปเชื้อเดี่ยว และเชื้อผสม มีแนวโน้มประชากรแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ส่วนไอเลียมสูงกว่า และ*Escherichia coli* ในส่วนซีกัมต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

Jin, et al. (1998) ได้ใช้ *Lactobacillus acidophilus* I 26 เพื่อเป็นโปรไบโอติกในไก่เนื้อ พบว่าช่วยลดจำนวน Coliforms ในส่วน Cecum ปริมาณกรดไขมันที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total VFA) ในส่วน Ileum และ Cecum เพิ่มขึ้น และค่ากรดด่างในส่วน Cecal ลดลง อย่างไรก็ตามปริมาณประชากรของ *Lactobacillus* ในส่วนของ Ileum และ Cecum ของไก่เนื้อไม่เพิ่มขึ้นจากการทดลอง 30 วันหลังการให้อาหาร

2.4.2 การศึกษาจุลินทรีย์ชนิดอื่นร่วมกับ *Bacillus* เป็นโปรไบโอติกในไก่เนื้อ

การศึกษาไก่เนื้ออายุ 1 วันที่ได้รับโปรไบโอติกเชื้อผสมซึ่งประกอบด้วย Rumen Bacterium MG-2, *Lactobacillus plantarum* IFS-1, *Lactobacillus plantarum* IG-3, *Bacillus* sp. และยีสต์ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1 : 1 : 1 (M1) และ 1 : 1 : 1 : 0.5 : 0.5 (M2) ตามลำดับ พบว่าไก่กลุ่มที่เสริมโปรไบโอติก M1 และM2 มีจำนวนเชื้อ *Escherichia coli* ลดลงในส่วนของลำไส้ Ileum และ Cecum (วรการ, 2550)

บุญเรียง (2544) ศึกษาจุลินทรีย์โปรไบโอติก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lavtobacillus acidophilus*, *Pediococus* KUL2, *Saccharomyces cerevisiae* Y77 และ*Bacillus subtilis* B31 พบว่าเชื้อโปรไบโอติกทั้งหมดสามารถอยู่รอดในลำไส้ไก่ได้ และไก่ที่ได้รับโปรไบโอติกมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงกว่ากลุ่มควบคุม (มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์) และทำให้เชื้อ *Escherichia coli* ในลำไส้ไก่ลดลงอีกด้วย

แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bacillus* นั้นเป็นแบคที่เรียที่พบบ่อยในการใช้เป็นจุลินทรีย์ โปรไบโอติก *Lactobacillus* เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่จะมีอยู่ในลำไส้ไก่ และส่วนมากจะอยู่บริเวณลำไส้เล็ก ซึ่งผลิตกรดผ่านกระบวนการหมัก ทำให้ค่ากรดด่างที่ลดลงในระบบย่อยอาหารของลำไส้และเป็นประโยชน์ต่อลำไส้โดยช่วยต่อต้านเชื้อก่อโรค และสามารถยับยั้งบางสายพันธุ์ของ *Salmonella* ได้ ซึ่งแบคทีเรียในจีนัส *Salmonella* ที่ก่อโรคในสัตว์ปีก ได้แก่ *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella* ser. Heidelberg, *Salmonella* ser. Montevideo, *Salmonella* ser. Saintpaul และ*Salmonella* ser. I 40 (Gong, et al., 2002; Gong, et al., 2007; Dunkley, et al., 2009)

2.4.3 การศึกษา *Bacillus* เป็นโปรไบโอติกในไก่เนื้อ

Bacillus subtilis PY79 ($2.5x10^8$ spore) ใช้เป็นโปรไบโอติกในไก่ เพื่อควบคุมเชื้อก่อโรค *Escherichia coli* serotype O78 : K80 พบว่าปริมาณการเกิด Colonization ของ *Escherichia coli* serotype O78 : K80 ลดลงมากกว่า 2 log ในลำไส้ เช่นเดียวกับการนับโดยตรงจาก Cecum ซึ่งมีค่าลดลงมากกว่า 3 log (Ragione, et al., 2001) นอกจากนี้ *Bacillus subtilis* PY79 (1×10^9 spores) สามารถควบคุมเชื้อ *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* ในไก่สาวให้มีปริมาณลดลงได้ (Ragione and Woodward, 2003)

Chaiyawan, et al. (2010) แยกเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ T3-1 จากการจากชิ้นส่วนของลำไส้ Duodenum Jejunum and Ileum รวมทั้ง Cecum ของไก่พื้นบ้าน พบว่าเชื้อนี้ไวต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในทางการแพทย์ และสามารถต้านทาน *Clostridium perfrigens* ATCC 15191 ได้สปอร์ของเชื้อสามารถทนต่อน้ำย่อยเทียมของกระเพาะและลำไส้เล็ก ทนความร้อนชื้นได้ถึง 100 องศาเซลเซียส และอยู่รอดในน้ำที่มีครอรีนเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม ได้นาน 120 นาที นอกจากนี้ยังสามารถยึดเกาะผิวเซลล์ Caco-2 รวมทั้งสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้

Lee, et al. (2010) ศึกษาการใช้ *Bacillus* เป็นโปรไบโอติกในไก่เนื้อ พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ Bs27, 15AP4, LSSAO1, 3AP4 หรือ Bs18 ช่วยกระตุ้นการเพิ่มภูมิคุ้มกันในไก่เนื้อ และลดการเกิดแผลในลำไส้ไก่ที่เกิดจากการติดเชื้อ *Eimeria maxima* (EM) อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

Samanya and Yamauchi (2002) ศึกษาการใช้ *Bacillus subtilis* var natto แห้ง เป็นโปรไบโอติกในไก่ โดยให้โปรไบโอติกผสมอาหารเป็นเวลา 28 วัน พบว่าไก่ที่ได้รับโปรไบโอติกมีความเข้มข้นของแอมโมเนียในเลือดลดลงซึ่งส่งผลต่อการทำงานของเนื้อเยื่อผนังลำไส้ ทำให้ผนังลำไส้ดูดซึมสารอาหารได้ดีขึ้น

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

2.5 แบคทีเรียสกุล *Bacillus*

Bacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างท่อน (Rod) เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสปอร์ทั้งในที่ ๆ มีออกซิเจน (Aerobic) หรือ Facultatively Anaerobic ปริมาณเบสของ DNA ซึ่งยืนยันโดย 16S rRNA อยู่ในช่วงประมาณ 33 mol% G+C (*Bacillus* cereus) ถึงมากกว่า 60% สำหรับ Extreme Thermophiles (Priest, 2010) สามารถเคลื่อนที่โดย Peritrichous Flagella หรือไม่เคลื่อนไหว สามารถย่อยโปรตีนเพื่อการผลิตของแอมโมเนีย ใช้คาร์โบไฮเดรตในการผลิตกรด นอกจากนี้ยังผลิตก๊าซให้ผล Catalases บวก อุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปทั้งในสิ่งมีชีวิต และสิ่งแวดล้อม พบมากในดิน ในสัตว์เล็กน้อยแมลง ปรสิต หรือเชื้อโรค (Williams and Wilkins, 1957)

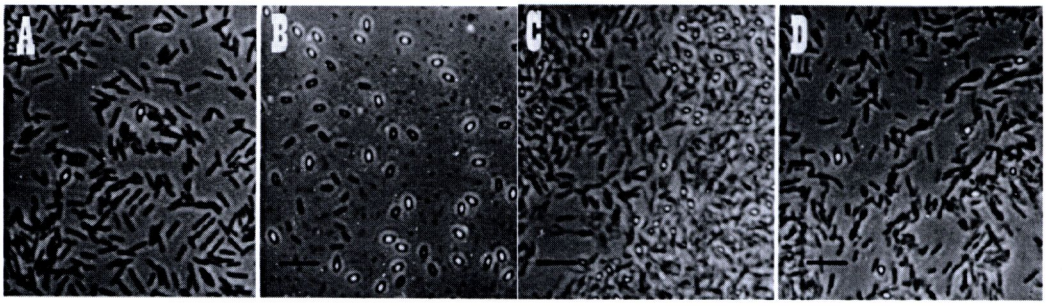
2.5.1 Genus *Bacillus*

อาจแบ่งเป็นกลุ่มกว้าง ๆ ได้ 6 กลุ่ม ซึ่งมีประมาณกว่า 60 สายพันธุ์ (Priest, 2010)

กลุ่มที่ 1 *Bacillus polymyxa*

Bacillus ทุกสายพันธุ์ในกลุ่มนี้เป็น Facultative Anaerobe และเจริญได้ดีในที่ไม่มีออกซิเจน ผลิตกรดจากการใช้น้ำตาล เอนโดสปอร์ (Endospores) เป็น Ellipsoidal และ Mother Cell บวม และมีความต้องการของการเจริญเติบโตที่จุกจิกพอสมควรในรูปแบบของวิตามินและกรดอะมิโน และสามารถหลั่งสารประเภทคาร์โบไฮเดรตออกนอกเซลล์จำนวนมาก ได้แก่ อะไมเลส, β-Glucanase รวมทั้ง เซลลูเลสและ เพกติเนส

Bacillus ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Bacillus alvei*, *Bacillus cirvulans*, *Bacillus amylolyticus*, *Bacillus azotofixans*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus larvae*, *Bacillus macerans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus macquariensis*, *Bacillus pabuli*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus psychrosaccharolyticus*, *Bacillus pulvifaciens*, *Bacillus thiaminolyticus*, *Bacillus validus*, *Bacillus infernus* และ *Bacillus macerans*



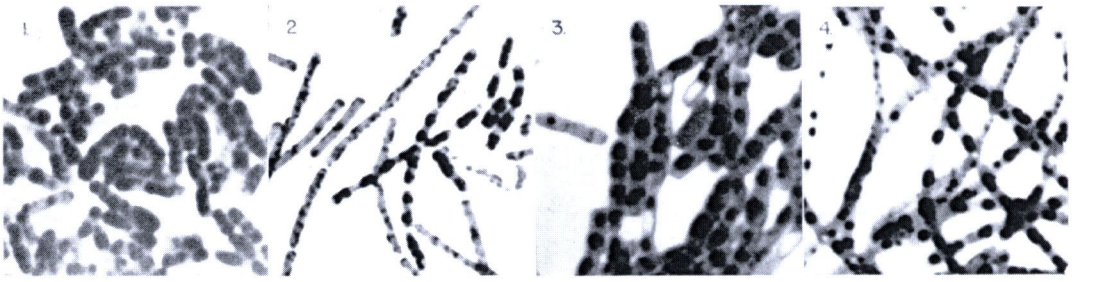
ภาพที่ 2-5 Photomicrographs โดยการ Wet Mounts จากการเพาะเลี้ยงสปอร์ของ *Bacillus azotofixans* A) Strain F-100, B) Strain BE-4, C) Strain P3L-5T, D) Strain TE-10, Bar = 10 ไมโครเมตร (Seldin, Elsas and Penido, 1984)

กลุ่มที่ 2 *Bacillus subtilis*

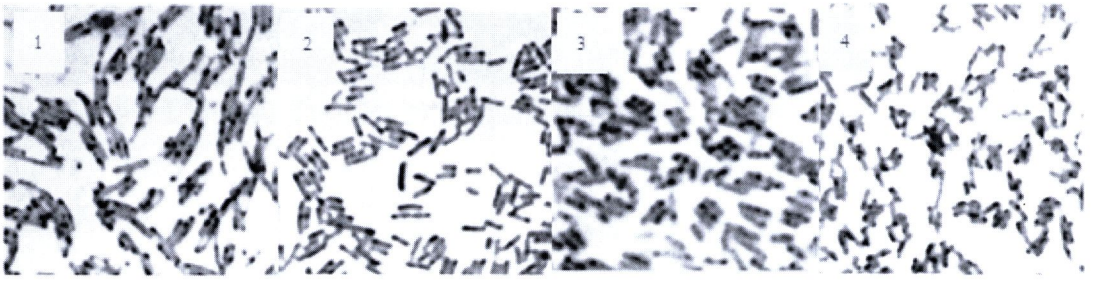
Bacillus ทุกสายพันธุ์ในกลุ่มนี้ผลิตกรดจากการใช้น้ำตาล สร้างสปอร์รูป Ellipsoida และ Mother Cell ไม่บวม ส่วนใหญ่สามารถเจริญหรือเติบได้น้อยเมื่ออยู่ในสภาวะไม่มีออกซิเจน (Strict Aerobes) แต่ไม่ทั้งหมด ตัวอย่างเช่น *Bacillus subtilis* มีความสามารถจำกัดในการหมักน้ำตาล และสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในสภาวะไร้ออกซิเจนเมื่อมีกลูโคสและไนเตรท (Nitrate) เป็นตัวรับอิเล็คตรอนเป็นตัวสุดท้าย บางสายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus thuringiensis* เป็น Facultative Anaerobic แบคทีเรียในสายพันธุ์นี้ปลดปล่อยเอนไซม์ออกนอกเซลล์ ซึ่งรวมไปถึงเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางการค้า ได้แก่ อะไมเลส, โปรติเอส และ β-Glucanases เป็นต้น

Bacillus ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus carotarum*, *Bacillus firmus*, *Bacillus flexus*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus niacin*, *Bacillus pantothenticus*, *Bacillus simplex*, *Bacillus thuringiensis* และ *Bacillus cereus*

ภาพที่ 2-6 เซลล์ *Bacillus megaterium* ที่คัดแยกจาก Phyllosphere ของหญ้า (*Tillandsia bartramii)* แสดงสปอร์ และ Spheric Stores (Polyhydroxibutyrrate) ที่ชัดเจน (TEM Photography 18,000X) (Brighigna, et al., 1992)



ภาพที่ 2-7 Fixed Smears ของ *Bacillus* ย้อมด้วย Sudan Black B แล้วล้างด้วย Xylol และย้อมทับ Safranin แสดง Intracellular Lipid Material (Dark Granules และ Areas) หลังการเพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง บน Plain Tryptose Agar Slants (กำลังขยาย 2500X) : 1) *Bacillus megaterium*, 2) *Bacillus mycoides,* 3) *Bacillus cereus* และ 4) *Bacillus anthracis* (Burdon, 1956)



ภาพที่ 2-8 Fixed Smears หลังการบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมงบน Plain Tryptose Agar Slant ของ Intracellular Lipid Material ด้วย Sudan Black B-Safranin โดยที่ 1) *Bacillus licheniformis*, 2) *Bacillus subtilis*, 3) *Bacillus brevis* และ 4) *Bacillus sphaericus* (Burdon, 1956)

กลุ่มที่ 3 *Bacillus brevis*

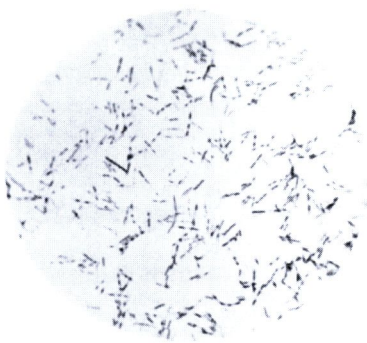
Bacillus ในกลุ่มนี้ค่อนข้างมีลักษณะทางสรีรวิทยาไม่เหมือนกัน *Bacillus brevis* เจริญในที่มีออกซิเจนเท่านั้น (Strict Aerobe) ไม่สามารถผลิตกรดจากการหมักน้ำตาล สร้างสปอร์รูป Ellipsoida และ Mother Cell บวม ตัวอย่าง *Bacillus* ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Bacillus alginolytic, Bacillus aneurinolyticus, Bacillus azotoformans*, *Bacillus badius, Bacillus brevis*, *Bacillus chondroitinus, Bacillus gordonae* และ *Bacillus freudenreichii*

ภาพที่ 2-9 การย้อม Spores ของ *Bacillus brevis* ด้วย Dyar's Cell Wall Stain เกิดสีของ Congo Red รอบ ๆ Spore (Light micrograph 2,000X) (Dondero and Holbert, 1957)

กลุ่มที่ 4 *Bacillus sphaericus*

Bacillus ในกลุ่มนี้เจริญในที่มีออกซิเจนเท่านั้น ทุกสายพันธุ์สร้างสปอร์รูป Spherical และ Mother Cell อาจบวม ผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดอะมิโน L-lysine หรือ Ornithine บางสายพันธุ์มีความสามารถที่จำกัดในการผลิตกรดจากการหมักน้ำตาล ส่วน *Bacillus sphaericus* ไม่สามารถใช้น้ำตาลสำหรับการเจริญเติบโต อะซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน กรดอะมิโน ตัวอย่างเช่น Arginnine, Glutamate และ Histidine สามารถถูกเมตาโบไลซ์ได้

Bacillus ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Bacillus fusiformis, Bacillus aminovorans, Bacillus marinu, Bacillus pasteurii, Bacillus psychrophilu, Bacillus sphaericus*, *Bacillus globisporus* และ *Bacillus insolitus*

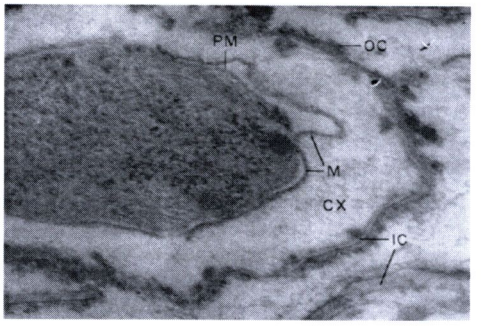


ภาพที่ 2-10 *Bacillus fusiformis* เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน (1000X) (Smith, 1932)

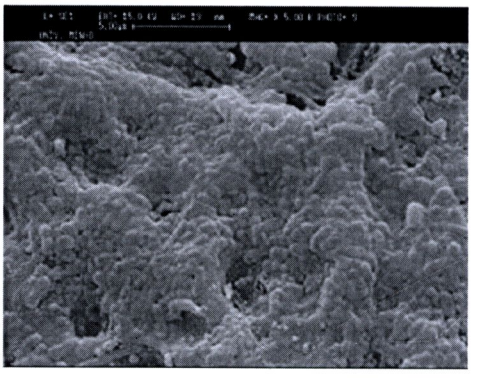
กลุ่มที่ 5 Thermophiles bacilli

*Bacillus*ในกลุ่มนี้สามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า สร้างสปอร์รูป Oval และ Mother Cell บวม บางสายพันธุ์ เช่น *Bacillus schlegelii* เป็น Chemolithoautotrophs ซึ่งสามารถเจริญเติบโตโดยใช้คาร์บอนไดออกไซด์ และคาร์บอนมอนอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน

Bacillus ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Bacillus coagulans, Bacillus flavothermus, Bacillus kaustophilus, Bacillus pallidus, Bacillus schlegelii, Bacillus smithii, Bacillus stearothermophilus, Bacillus thermocatenulatus, Bacillus tusciae, Bacillus thermodenitrificans, Bacillus thermocloacae, Bacillus thermoglucosidasius, Bacillus thermooleovorans* และ *Bacillus thermoruber*



ภาพที่ 2-11 การตัดขวาง Partly Disrupted Spores ของ *Bacillus stearothermophilus* แสดงความสัมพันธ์กันของตำแหน่งและโครงสร้างของ Outer (OC) และ Inner Coats (IC), Cortex (CX), membrane (M) และ Spore Protoplasmic Membrane (PM) (130,000X) (Warth, et al., 1963)



ภาพที่ 2-12 การเกิดไบโอฟิล์มของ *Bacillus coagulans* บน Granular Activated Carbon (SEM) (Quintelas, et al., 2008)

กลุ่มที่ 6 *Alicyclobacillus*

Bacillus กลุ่มนี้เป็นสายพันธุ์กลุ่มใหม่พวก Thermophilic, Acidophilic ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์เป็น ω-Alicyclic Fatty Acids

Bacillus กลุ่มนี้ ได้แก่ *Alicyclobacillus acidocaldarius, Alicyclobacillus acidoterrestris* และ *Alicyclobacillus cycloheptanicus*

2.5.2 สารยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ผลิตโดย *Bacillus* spp.

สารยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคที่ผลิตโดย *Bacillus* spp. มีหลายชนิด ได้แก่ กรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกติกและกรดอะซิติก เอนไซม์โปรติเอส (Santong, et al., 2008a) และแบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะประเภทเปปไทด์ ที่ผลิตโดยแบคทีเรียมีความสามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นได้ ซึ่งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและลบสามารถผลิตได้ (Cleveland, et al., 2001) *Bacillus* ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ เช่น *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ 19 ที่แยกจากการหมักของเสียพวกผักสามารถยับยั้ง *Salmonella typhimurium* และ *Staphylococcus* (Khalil, et al., 2009) *Bacillus amyloliquefaciens* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ก่อเกิดการเน่าเสียในอาหารได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens* และ *Pasteurella haemolytica* (Lisboa, et al., 2006)

การแยกและจำแนกชนิดของเชื้อ *Bacillus* spp. จากลำไส้ของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannmei*) ที่เลี้ยงในฟาร์มเอกชน พบว่าเป็นสายพันธุ์ *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* และ *Bacillus sphaericus* พบว่า *Bacillus licheniformis* ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* เมื่อทดสอบด้วยวิธี Cross Streak และ*Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans* และ *Bacillus sphaericus* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi* ด้วยวิธี Co-Culture ในน้ำเค็ม 20 ppt โดยสามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ลงได้ 67.86, 58.59 และ78.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจาก *Bacillus* sp. ชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (มินตรา, 2552)

2.5.3 เอนไซม์ช่วยย่อยอาหาร

Bacillus สามารถสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหารได้หลายชนิด ซึ่งมีความสำคัญต่อการย่อยอาหารในระบบทางเดินอาหารของไก่ เช่น

2.5.3.1 เอนไซม์อะไมเลส

เอนไซม์อะไมเลส (Amylase) ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ถูกขับออกมาภายนอกเซลล์ (Extracellular Enzyme) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) แป้ง (Starch) และไกลโคเจน (Glycogen) ให้เป็นน้ำตาล อะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีสมบัติในการทนความร้อนได้ดีกว่าที่ผลิตจากเชื้อรา (สมศักดิ์, 2550)

ตัวอย่างการศึกษา *Bacillus* spp. ที่ผลิตเอนไซม์ อะไมเลส เช่น จักรพันธ์ และสุพรรนี (2552) สามารถคัดแยก *Bacillus* spp. ที่ผลิตเอนไซม์ อะไมเลสด้วยอาหาร Starch Agar โดยวงใสเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 5.0 มิลลิเมตร

Bacillus macerans, Bacillus coagulan, Bacillus licheniformis, Bacillus circulans, Bacillus magaterium, Bacillus polymyxa, และ *Bacillus subtilis* (amylolytic *Bacillus* species) ที่คัดแยกได้

จากดิน ของเสีย น้ำ และแหล่งอาหาร พบว่า สามารถเพาะเลี้ยงได้ใน Soluble Starch และ Corn Starch เป็นซับสเตรทหลักของการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดี (Ajayi and Fagade, 2003)

Sreekumar and Soundarajan (2010) คัดแยก *Bacillus subtilis* SK09 จากนมทิ้ง (Dairy Effluent) พบว่าสามารถที่จะผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดยการย่อยแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์ β-Galactosidase

การศึกษาคัดแยก *Bacillus* จากอุตสาหกรรม พบว่า *Bacillus* ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โดยการใช้น้ำตาลมอลโทสในการเป็นแหล่งคาร์บอน Peptone และYeast Extract เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.4631μmole/min/ml (Thippeswamy, Girigowda and Mulimani, 2006)

2.5.3.2 เอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอส (Protease) เป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ที่ทำหน้าที่ในการตัดพันธะเพปไทป์ ดังนั้นจึงมีบทบาทสำคัญอย่างมากในการย่อยโปรตีน (สมศักดิ์, 2550) นอกจากนั้นยังควบคุมการแข็งตัวของเลือด ควบคุมการจับเชื้อโรคโดยการย่อยสลายโปรตีนจากภายนอก มีการใช้เอนไซม์นี้ในอาหารสัตว์เพื่อช่วยย่อยอาหาร (ปราณี, 2535)

ตัวอย่างการศึกษาเกี่ยวกับ *Bacillus* spp. ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส เช่น จักรพันธ์ และสุพรรนี (2552) คัดเลือก *Bacillus* spp. ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากดินด้วยอาหาร Skim Milk Agar พบว่ามีวงใสเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 15 มิลลิเมตร บุปผา และคณะ (2527) แยก *Bacillus subtilis* (T1STR 25) และ *Bacillus licheniformis* (TISTR 18) จากดินในประเทศไทยที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสในปริมาณสูง

Jamilah, et al. (2009) ศึกษาการคัดแยก *Bacillus* spp. จากบ่อกุ้งทั้งหมดจากดินตะกอนน้ำและลำไส้กุ้ง (Shrimp Intestine) ที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสและแอลฟาอะไมเลส พบสายพันธุ์ DA 5.2.3 แสดงกิจกรรมการสร้างเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด 40.9 U/mg

Santong, et al. (2008a) แยก *Bacillus* sp. ที่ผลิตโปรติเอสที่ทนความร้อนสูงจากน้ำนมดิบ 40 ตัวอย่าง พบว่า สายพันธุ์ BA26 และBA27 แสดงกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด 12 U/mg

2.5.3.3 เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส (Lipase) เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (Hydrolase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล ที่พบทั่วไปได้ทั่วทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์หลายชนิด (สมศักดิ์, 2550) เนื่องจากไลเปสมีคุณสมบัติที่สามารถไฮโดรไลซ์เอสเทอร์ของกรดไขมันและแอลกอฮอร์ ได้มีคัดเลือก *Bacillus* spp. ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดิน (จักรพันธ์ และสุพรรนี, 2552) ด้วยอาหาร Tributyrin Agar ซึ่ง *Bacillus* isolate 3 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยวงใสเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 5.0 มิลลิเมตร Sekhon, et al. (2006) แยก *Bacillus megaterium* AKG-1 จากดิน พบว่าเชื้อสามารถผลิต

เอนไซม์ไลเปสที่ทนความร้อน โดยใช้ Mannitol 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตเอนไซม์ (848 unit/ml) นอกจากนั้นการรายงานของ Kanimozhi, Devairrakam and Jegadeeshkumar (2011) *Bacillus subtilis* ที่คัดแยกได้จากดินสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้สูงในช่วง 0.01033 และ 0.01066 µg/min/ml

2.5.3.4 เอนไซม์เซลลูเลส

สับสเตรทของเซลลูเลสคือ เซลลูโลส ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีมากที่สุดในธรรมชาติชนิดหนึ่ง เป็นโพลีเมอร์ที่ละลายน้ำได้น้อยมาก ดังนั้นปฏิกิริยาจึงช้า (Inert) ต่อพวกไฮโดรเลส หรือ Hydrolytic Enzyme เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสและอนุพันธ์ของเซลลูโลส ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน คือ 1) Hydrogen Bondase ทำหน้าที่กระตุ้นหรือแตกสลายเซลลูโลสให้มีสภาพที่เหมาะสม พันธะไฮโดรเจนอ่อนตัวลง จากนั้น 2) β-1,4 Glucanases จะย่อยพันธะในเซลลูโลส หรืออนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้ แต่ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรทที่มีโครงสร้างซับซ้อนได้ ประกอบด้วย Endo-β-1,4 Glucanases และ Exo-β-1,4 Glucanases และ 3) β-Glucocidases จะย่อย Cellobiose ถึง Cellohexose (กลูโคสจาก 2-6 Unit) ผลผลิตที่ได้คือกลูโคส ซึ่งมี Configuration เปลี่ยนจากเดิม (ปราณี, 2535)

ธิปชัย (2546) ได้ศึกษาคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ พบว่า *Bacillus subtilis* ที่คัดแยกมาจากดินในจังหวัดเชียงใหม่ ที่มีความสามารถในการต้านราและสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ 8 สายพันธุ์ ด้วยการวัดความสามารถสูงด้วยวิธี Carbomymethyl Cellulose Clering Assay ซึ่งเป็นวิธีในการหาความสามารถในการย่อยเซลลูโลสโดยดูจากขนาดของวงใส สายพันธุ์ที่ให้ขนาดวงใสที่ใหญ่เป็น 4 อันดับแรก คือ No.24, 4, 6 และ20 ตามลำดับ จากนั้น นำเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ หาแอคติวิตี้ของเซลลูเลสด้วย 2 วิธี คือ Filter Paper Activity (FPAase) ซึ่งเป็นการหาแอคติวิตี้ของ β (1-4) Exo-Glucanase พบสายพันธุ์ No.24 ให้ค่าสูงสุดคือ 20.22 mIU/ml และวิธี Carboxymethyl Cellulase Activity (CMCase) ซึ่งเป็นวิธีการหาแอคติวิตี้ของ β (1-4) Endo-Glucanase พบสายพันธุ์ No.24 ให้ค่าสูงสุดคือ 30.91 mIU/ml

Bacillus ที่คัดแยกจากดินและน้ำบริเวณ Amazon (Heck, Hertz and Ayub, 2002) พบว่า *Bacillus* sp. BL16 และ *Bacillus subtilis* BL62 แสดงกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสในระดับสูงเท่ากับ 0.89 และ 1.08 UI/mg ptotein

2.5.4 *Bacillus* spp. ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก

การใช้ *Bacillus* spp. สำหรับการเป็นโปรไบโอติกในสัตว์ มีการศึกษาอย่างมากมาย ตัวอย่างเช่นรายงายการใช้ *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus* และ *Bacillus subtilis* ที่คัดแยกจากกุ้ง *Penaeus monodon* เพื่อใช้ในการเป็นโปรไบโอติกในการยับยั้ง *Vibrio harveyi* ที่ติดเชื้อใน Black Tiger Shrimp ลดลงจาก 87.53 เปอร์เซ็นต์ ไปจนถึง 99.76 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับกลุ่มควบคุม

ซึ่งได้จากผลการส่องด้วยวิธี Scanning Electron Microscope และวัดคุณสมบัติ Immunostimulatory จากปริมาณ Hemocytes, Phenoloxidase, Superoxide Anion, Clearance Ability และBactericidal Activity ที่เพิ่มขึ้น (Purivirojkul, Maketon and Areechon, 2005)

การศึกษาการใช้สปอร์ของ *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus sutilis* ผสมอาหารเป็นโปรไบโอติกเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่าที่ระยะ 30 วัน การใช้ *Bacillus licheniformis* ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้องค์ประกอบทางภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่ ทั้งปริมาณเม็ดเลือดรวมกิจกรรมของเอนไซม์ Phenoloxidase กิจกรรมของเม็ดเลือดในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Percent Phagocytosis) และกิจกรรมของน้ำเลือดในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Bactericidal Activity) สูงกว่าชุดทดลองอื่น เมื่อหยุดให้อาหารผสมโปรไบโอติก ระดับภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่จะลดลง ยกเว้นค่า Percent Phagocytosis และกุ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมโปรไบโอติกในทุกชุดการทดลองมีจำนวนเชื้อ *Vibrio* spp. ในลำไส้น้อยกว่าชุดควบคุม (มินตรา, 2552)

การคัดแยกเชื้อจากปลานิล (Tilapia) บริเวณช่องจมูก สมอง ลำไส้และไต เป็นสายพันธุ์ *Bacillus licheniformis* ใช้เป็นโปรไบโอติกในปลานิลเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิต ซึ่งเชื้อไม่มีการรายงานเป็นเชื้อก่อโรคในปลา (Pasnik, Evans and Klesius, 2008)

การศึกษาสายพันธุ์ *Bacillus* ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus pumilus* ในเชิงการค้า เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่ประกอบด้วยสปอร์ของแบคทีเรียมีที่มีศักยภาพ (Colonization, Immunostimulation และมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ) ซึ่ง *Bacillus cereus* 3 สายพันธุ์ แสดงการมีชีวิตในทางเดินอาหารของหนูได้ถึง 18 วัน สปอร์ของ *Bacillus cereus* ถูกกระตุ้นในสภาวะกระเพาะอาหารและของเหลวในลำไส้ สปอร์ของทุกสายพันธุ์มีสร้างภูมิคุ้มกันเมื่อให้หนูทางปาก แต่สายพันธุ์ *Bacillus pumilus* พบในการสร้าง Anti-Spore Immunoglobulin G ปริมาณสูง สปอร์ของ *Bacillus pumilus* และสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* ในห้องปฏิบัติการ พบการชักนำให้เกิด Proinflammatory Cytokine Interleukin-6 จากการเพาะเลี้ยงใน Macrophage Cell Line และใน *in vivo* สปอร์ของ *Bacillus pumilus* และ *Bacillus subtilis* และชักนำ Proinflammatory Cytokine Tumor Necrosis Factor Alpha และ Th1 Cytokine Gamma Interferon นอกจากนั้น *Bacillus pumilus* และ*Bacillus cereus* (*Bacillus cereus* var. vietnami) พบว่าสามารถผลิตกิจกรรมคล้ายกับแบคเทอริโอซินในการต่อต้าน *Bacillus* สายพันธุ์อื่น ๆ จากผล Colonization, Immunostimulation และกิจกรรมการต้านจุลชีพ แสดงผลในการเป็น โปรไบโอติกที่มีศักยภาพ อย่างไรก็ตาม 3 สายพันธุ์ ของ *Bacillus cereus* พบการผลิต Hbl และ Nhe Enterotoxins ซึ่งไม่ปลอดภัยสำหรับการใช้งานของมนุษย์ แต่สายพันธุ์อื่นยังไม่พบ (Duc, et al., 2004)

การศึกษาการใช้ *Bacillus* CIP 5832 ในการเป็นโปรไบโอติกผสมในอาหารสุนัข เซลล์เริ่มต้น 7.5 x 10^8 cfu ของ *Bacillus* CIP 5832 เพื่อดูการรอดชีวิตในระบบย่อยอาหารของสุนัขเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จนถึง 2 และ 4 วัน โดยการวัดการปรากฏของเชื้อในอุจจาระ แสดง *Bacillus* CIP 5832 ปริมาณ 29.6 เปอร์เซ็นต์ และ Vegetative Form 69.9 เปอร์เซ็นต์ จากสุนัข 5 ตัว ผลของ *Bacillus* CIP 5832 ต่อปริมาณ Drying matter, Protein, Lipid และMetabolizable Energy Digestibility แม้ว่ามีการแสดงการปรับปรุงการย่อยสลายเพียงเล็กน้อยด้วยโปรไบโอติก แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัย ในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเติม *Bacillus* CIP 5832 ในอาหารแห้งของสุนัขมีความเป็นไปได้แล้วแต่กรณี ซึ่งสามารถอยู่รอดและแบ่งตัวในระบบย่อยอาหารของสุนัข (Biourge, et al., 1998)

การรายงาน เชื้อ *Bacillus* ที่คัดแยกได้จากอุจจาระไก่เป็นจำนวนมาก สำหรับการใช้เป็นโปรไบโอติก ได้แก่ *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus firmus* และ *Bacillus cereus* (Barbosa, et al., 2005)

Ragione, et al. (2001) พบ *Bacillus subtilis* สามารยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* O78 : K80 ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อโรคในสัตว์ปีก Avian Colibacillosis จากการทดลองในไก่พบว่าจำนวนโคโลนีเดี่ยว 2.5 x 10^8 สปอร์ เพียงพอที่จะยับยั้ง *Escherichia coli* O78 : K80 โดยทำให้เชื้อก่อโรคลดลงมากกว่า 2 log จากการนับโคโลนีในลำไส้ และวัดจำนวนโดยตรงจากบริเวณ Caecal พบเชื้อก่อโรคลงมากกว่า 3 log นอกจากนี้ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์นี้ยังสามารถใช้ควบคุมเชื้อ *Salmonella enterica* serotype *Enteritidis* และ*Clostridium perfringens* ในไก่ได้ โดยให้เชื้อเป็นสารแขวนลอยสปอร์ของ *Bacillus subtilis* ทุก 1 วัน และ 20 วัน ก่อนที่จะทดสอบความต้านทานกับ *Salmonella enteritidis* (S1400) และ *Clostridium perfringens* ตามลำดับ พบว่า การให้เซลล์สปอร์ทางปากเท่ากับ 1 x 10^9 สปอร์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงเพียงพอที่จะหยุดการสร้างโคโลนีและการมีชีวิตของทั้ง *Salmonella Enteritidis* และ*Clostridium perfringens* โดยเฉพาะในการตรวจวัดในอุจจาระพบ *Salmonella Enteritidis* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในระยะเวลา 36 วันของการทดลอง และ *Bacillus subtilis* ยังคงมีชีวิตอยู่ในลำไส้ แม้จะมีจำนวนลดลงในช่วงเวลาเดียวกัน *Bacillus subtilis* อาจตัวแทนที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไข้หวัดนกและเชื้อโรคที่เกิดจากอาหารเป็นหลัก (Ragione and Woodward, 2003)

Teo and Tan (2006) ศึกษาการใช้ *Bacillus subtilis* PB6 ที่คัดแยกได้จากลำไส้ไก่ โดยให้ไก่กิน ผลการศึกษาพบว่าปริมาณ *Escherichia coli* ในลำไส้ไก่ลดลง และพบแบคทีเรียกลุ่ม Lactobacilli เพิ่มมากขึ้น

รายงานการใช้โปรไบโอติกสำหรับการเพาะเลี้ยงไก่เนื้อพบว่าการใช้ *Bacillus coagulans* NJ0516 ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกในการผสมให้ไก่กิน สามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอส

(Lowry) เอนไซม์อะไมเลส (Dinitrosalicylic Acid) และเอนไซม์ไลเปส (ปริมาณ Fatty Acids ของปฏิกิริยา Enzymatic Hydrolysis) จาก Crude ที่ได้จากส่วน Duodenum (Wang and Gu, 2010)

และเมื่อนำจุลินทรีย์ที่เป็นสารเสริมชีวนะ 4 สายพันธุ์ ทดลองเลี้ยงไก่เนื้อในฟาร์มระดับอุตสาหกรรมจำนวน 924 ตัว พบว่าการผสมเชื้อ *Pediococcus* KUL2, *Saccharomyces cerevisiae* Y77 และ *Bacillus subtilis* B31 แสดงการเจริญของไก่ช่วงอายุ 1 ถึง 21 วัน มีปริมาณทั้งน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมไม่ให้สารปฏิชีวนะ ส่วนการเจริญที่อายุ 22 ถึง 40 วัน และ 1 ถึง 40 วัน พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นและประสิทธิภาพการใช้อาหาร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัย ขณะที่ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดง ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และพลาสมาโปรตีน ที่อายุ 40 วัน ในทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัย แต่พบว่าไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับสารเสริมชีวนะมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงกว่ากลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้เชื้อ *Bacillus subtislis* B13, *Saccharomyces cerevisiae* Y77, *Lactobacillus acidophilus*, เชื้อผสม, *Pediococcus* KUL2 และกลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดเท่ากับ 98.70, 98.05, 96.76, 95.45 และ91.57 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าสารเสริมชีวนะมีผลทำให้เชื้อ *Escherichia coli* ในลำไส้ไก่มีปริมาณลดลงอีกด้วย (บุญเรียง, 2544)

2.6 การผลิต *Bacillus* spp.

ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของ *Bacillius* ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ธาตุบางชนิดที่สำคัญแต่ต้องการในปริมาณน้อย และวิตามิน นอกจากนี้ปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* คือสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ เช่น อุณหภูมิ ค่ากรดด่าง และปริมาณออกซิเจน เป็นต้น

2.6.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียทุกชนิดต้องสารอาหารในการเติบโต ซึ่งอาหารสำหรับหรับการเติบโตของจุลินทรีย์โดยทั่วไปมักเป็นสารอาหารที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ เรียกว่า Microelement หรือ Micronutrients สารอาหารนั้นได้แก่ ธาตุที่รวมกันเป็นประกอบส่วนประกอบ (คาร์บอน, ออกซิเจน, ไฮโดรเจน, ไนโตรเจน, ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส) ของคาร์โบไฮเดรต, ลิปิด, โปรตีน และกรดนิวคลีอิก นอกจากนั้นยังมีแร่ธาตุอื่น ๆ อีกที่มีอยู่ในเซลล์ ซึ่งเป็นไอออนบวกและมีหน้าที่หลากหลาย ตัวอย่างเช่น โพแทสเซียม, แคลเซียม, แมกนีเซียม และเหล็ก (Prescott, Harley and Klein, 2002)

2.6.1.1 แหล่งคาร์บอน

แบคทีเรียใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อเป็นแหล่งพลังงานมักร่วมกับออกซิเจนและไฮโดรเจน แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งหลังงาน และช่วยเสริมการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนเพื่อการเจริญเติบโต จุลินทรีย์

ที่เป็น Autotroph สามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์เพียงอย่างเดียวหรือใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อเป็นแหล่งพลังงานหลักในการสังเคราะห์สาร (Biosynthetic), การออกซิไดซ์โมเลกุลของสารอนินทรีย์และรับพลังงานจากการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอน ซึ่งการรีดิวซ์ของคาร์บอนไดออกไซด์นั้นเป็นกระบวนการที่ต้องใช้พลังงานจำนวนมาก จุลินทรีย์หลายชนิดไม่สามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวได้ แต่ต้องใช้โมเลกุลของสารที่มีความซับซ้อนลดลง เช่น น้ำตาลกลูโคส ในการเป็นแหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์ที่ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนคือพวก Heterotrophs ซึ่งส่วนใหญ่จะรีดิวซ์สารประกอบอินทรีย์เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ตัวอย่างเช่น กระบวนการ Glycolytic Pathway ผลิตโครงสร้างคาร์บอนสำหรับใช้สร้างและปลดปล่อยพลังงาน ได้แก่ ATP และ NADP (Prescott, Harley and Klein, 2002) ดังนั้นแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ที่ง่ายที่สุดก็คือ น้ำตาล หรืออาจอยู่ในรูปซับซ้อน เช่น แป้ง ของเสียจากอุตสาหกรรมเกษตร เช่น กากน้ำตาล (Molasses) และน้ำมะพร้าวกะทิ (Coconut Water)

ตัวอย่างรายงานเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยง *Bacillus* ด้วยแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ เช่น *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 มีการเจริญสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง ได้จำนวนเซลล์เท่ากับ 2.71 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร (พัชรินทร์, 2548) *Bacillus* sp. CUO3 สามารถเติบโตในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยมีความเข้มข้นของแป้งมันสำประหลังที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร (สุรเชษฐ์, 2547)

2.6.1.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นแหล่งที่จุลินทรีย์ต้องการเพื่อการเติบโตร่วมกับฟอสฟอรัส และซัลเฟอร์ แม้ว่าองค์ประกอบเหล่านี้อาจจะได้มาจากสารอาหารเดียวกับที่ได้จากแหล่งคาร์บอน ปกติจุลินทรีย์มักจะใช้สารอนินทรีย์ได้ดีเช่นเดียวกัน ไนโตรเจนนั้นมีความจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์กรดอะมิโน, Cofactor ของเอนไซม์ และสารอื่น ๆ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนในกรดอะมิโนและแอมโมเนียโดยตรงผ่านปฏิกิริยาของเอนไซม์ ได้แก่ Glutamate Dehydrogenase หรือ Glutamine Systhetase และGlutamate Synthase (Prescott, Harley and Klein, 2002) สารอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ ยูเรีย และสารอนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ส่วนฟอสฟอรัสมักพบในส่วนของกรดนิวคลีอิก, ฟอสฟอลิปิด, nDNA, Cofactor ต่าง ๆ, โปรตีนบางชนิด และส่วนประกอบเซลล์อื่น ๆ จุลินทรีย์ ส่วนใหญ่ใช้สารอนินทรีย์ฟอสเฟตในการเป็นแหล่งฟอสฟอรัส ฟอสฟอรัสที่มีระดับต่ำจะทำให้การจำกัดการเติบโตของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม ซัลเฟอร์มีความจำเป็นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนซีสทีอีน (Cysteine) เมไทโอนีน (Methionone), คาร์โบไฮเดรต, ไบโอติน (Biotin) และไทอะมีน (Thiamine) (Prescott, Harley and Klein, 2002)

2.6.1.3 แร่ธาตุ

แร่ธาตุเป็นสารอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณน้อย (โพแทสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียม แมงกานีส เหล็ก และสังกะสี) ซึ่งไอออนบวกที่มีบทบาทมากมายภายในเซลล์ ตัวอย่างเช่น โพแทสเซียมเป็นสารที่มีความต้องการเพื่อใช้สำหรับรวมกิจกรรมของเอนไซม์ในการสร้างโปรตีน, แคลเซียมมีส่วนช่วยทำให้เอนโดสปอร์ของแบคทีเรียทนความร้อน, แมกนีเซียมช่วยเป็น Cofactor ของเอนไซม์หลายชนิดที่มีความซับซ้อนเกี่ยวข้องกับ ATP และความคงตัวของไรโบโซม (Ribosome) และเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell Membrane), เหล็ก (Fe^{2+} และFe^{3+}) เป็นส่วนหนึ่งของ Cytochromes และ Cofactor ของเอนไซม์ และ ตัวพาอิเล็กตรอนของโปรตีน (Prescott, Harley and Klein, 2002)

2.6.1.4 วิตามิน

จุลินทรีย์สามารถเติบโตและแบ่งเซลล์ด้วยแร่ธาตุและแหล่งของพลังงาน ได้แก่ คาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และซัลเฟอร์ นอกจากนั้นจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ ถ้าขาดเอนไซม์หนึ่งหรือมากว่าหนึ่งชนิด จะไม่สามารถผลิตสารบางชนิดได้ แต่ต้องได้รับสารตั้งต้นจากสภาพแวดล้อม ซึ่งไม่สามารถสังเคราะห์ได้จากภายในเซลล์ เรียกว่า Growth Factors ซึ่งได้แก่ 1) กรดอะมิโน สำหรับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน 2) Purines และPyrimidines สำหรับกระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก และ 3) วิตามิน เป็นสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กใช้เป็นส่วนของ Cofactors ของเอนไซม์ และส่วนน้อยในการช่วยการเติบโต ตัวอย่างจุลินทรีย์บางชนิดที่ต้องการวิตามิน เช่น *Enterococcus Faecalis* ต้องการวิตามิน 8 ชนิด สำหรับการเติบโต (Prescott, Harley and Klein, 2002)

2.6.2 การควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อ (Prescott, Harley and Klein, 2002)

นอกจากจุลินทรีย์สามารถที่จะตอบสนองต่อความแตกต่างของสารอาหาร และการมีอาหารที่จำเพาะอย่างจำกัดแล้ว การเติบโตของจุลินทรีย์จะมีผลดีเยี่ยมโดยลักษณะทางเคมีและกายภาพทางธรรมชาติโดยรอบนั้นด้วย สิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลในการควบคุมการเติบโตของจุลินทรีย์ ที่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อม เช่น Extreme และInhospitable โปรคาริโอต (Prokaryote) สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ทุกหนทุกแห่ง ที่อยู่อาศัยจำนวนมากที่โปรคาริโอตเจริญเติบโตได้มักจะฆ่าสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เช่น *Bacillus infernus* สามารถมีชีวิตได้ที่ต่ำกว่า 1.5 ไมล์ จากพื้นผิวโลก ซึ่งไม่มีออกซิเจน และอุณหภูมิมากว่า 60 องศาเซลเซียส จะเห็นได้ว่าความสำคัญของปัจจัยทางด้านสภาวะแวดล้อมมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ปัจจัยที่สำคัญ ได้แก่ ตัวถูกละลาย, Water Activity, ค่าความเป็นกรดด่าง, อุณหภูมิ, ปริมาณออกซิเจน, ความดัน และการแผ่รังสี โดยจะกล่าวถึงรายละเอียดของปัจจัยหลักของสภาวะแวดล้อม ได้แก่

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

2.6.2.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมของสิ่งแวดล้อมมีผลต่อจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก จุลินทรีย์มีความไวต่ออุณหภูมิ เพราะปกติจุลินทรีย์เป็นเซลล์เดี่ยว (Unicellular) และมีอุณหภูมิที่จำเพาะแตกต่างกันออกไป จากเหตุที่อุณหภูมิในเซลล์มีผลโดยตรงจากอุณหภูมิที่อยู่รอบ ๆ เซลล์ ความสำคัญของอุณหภูมิที่มีอิทธิพลส่งผลต่อการเติบโต เนื่องมาจากความไวของอุณหภูมิมีผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้น เพราะค่า Velocity ของการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์คล้ายกับปฏิกิริยาทางเคมี ประมาณสองเท่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นทุก 10 องศาเซลเซียส เพราะว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น, เมตาโบลิซึมมักเกิดขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และจุลินทรีย์เติบโตอย่างรวดเร็ว แต่เมื่ออุณหภูมิสูงที่เกินความเหมาะสม ทำให้การเติบโตเป็นไปอย่างได้ช้า ที่อุณหภูมิสูงเกิดการทำลายจุลินทรีย์โดยทำให้เอนไซม์, สารตัวพาเพื่อการเคลื่อนย้าย และโปรตีนอื่น ๆ เสื่อมสภาพ เยื่อหุ้มเซลล์แตกเมื่ออุณหภิสูงมาก (Extremes), Lipid Bilayer ละลาย และสลายตัว นอกจากนั้นไม่มีการซ่อมแซมเซลล์ที่ถูกทำลายทำให้การเติบโตของจุลินทรีย์สั้นลง ส่วนที่อุณหภูมิต่ำมาก ๆ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์แข็งตัว และเอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้อย่างรวดเร็ว

2.6.2.2 ค่าความเป็นกรดด่าง

ค่าความเป็นกรดด่างนั้นเป็นสิ่งที่วัดจากกิจกรรมไอออนของไฮโดรเจนของสารละลายจุลินทรีย์นั้นสามารถเจริญได้ในช่วงของกรดด่างที่กว้าง ได้ตั้งแต่ที่ค่ากรด 1 และ 2 ไปจนถึงค่าที่เป็นด่าง เช่น ในทะเลสาบและดินมีค่าระหว่าง 9 ถึง 10 จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีช่วงค่ากรดด่างสำหรับการเติบโตและเติบโตได้ดีที่สุดที่แตกต่างกัน ได้แก่

ก) Acidophiles มีช่วงการเติบโตระหว่าง 0 ถึง 5

ข) Neutrophiles มีช่วงการเติบโตระหว่าง 5.5 ถึง 8

ค) Alkalophiles มีช่วงการเติบโตระหว่าง 8.5 ถึง 11.5

แม้ว่าจุลินทรีย์จะสามารถเจริญเติบโตในที่มีกรดด่างช่วงกว้างได้ บางชนิดมักมีขีดจำกัดในการทนทานต่อความรุนแรงที่แตกต่างของค่ากรดด่างใน Cytoplasmic สามารถทำให้จุลินทรีย์เกิดอันตรายได้โดยไปรบกวน Plasma Membrane และยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ และการขนส่งโปรตีน โปรคาริโอตตายเมื่อมีค่ากรดด่างต่ำกว่า 5.0 ถึง 5.5 การเปลี่ยนแปลงค่ากรดด่างภายนอกเซลล์ไม่เพียงเปลี่ยนแปลงประจุ (Ionization) ของสารอาหารแต่ยังลดการเข้าถึงของสารอาหารสู่องค์ประกอบของเซลล์ อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์สามารถที่จะปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมในสภาวะที่ค่ากรดด่างเปลี่ยนแปลง จุลินทรีย์พวก Extream Alkalophile เช่น *Bacillus alcalophilus* สามารถที่จะรักษาค่ากรดด่างภายในให้เป็นกลางโดยการเปลี่ยนแปลงไอออนของโซเดียมภายในเซลล์กับโปรตรอนที่อยู่ภายนอกเซลล์

2.6.2.3 ปริมาณออกซิเจน

จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญในที่มีออกซิเจนเป็นพวก Aerobe ในขณะที่สามารถเจริญในที่ไม่มีออกซิเจนเป็นพวก Anaerobe พวก Facultative Anaerobe ไม่ต้องการออกซิเจนสำหรับการเจริญเติบโตแต่เจริญได้ดีเมื่อมีออกซิเจน Aerotolerent Anaerobe เช่น *Enterococcus Faecalis* ไม่ต้องการออกซิเจน และเจริญได้ในที่มีหรือไม่มีออกซิเจน จุลินทรีย์ที่เจริญได้ในที่มีออกซิเจนเรียกว่า Obligate Aerobe ออกซิเจนจะเป็นตัวรับอิเล็กตรอนเป็นตัวสุดของขั้น Electron-Transport Chain ในกระบวนการหายใจแบบใช้อากาศ ส่วนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเรียกว่า Obligate Anaerobe พวกนี้จะไม่ทนในสภาวะที่มีออกซิเจน เช่น *Clostridium pasteurianum*, *Methanococcus* ทั้งพวกที่ทนต่อออกซิเจนและพวก Stric Anaerobe ไม่สามารถสร้างพลังงานผ่านกระบวนการหายใจ ต้องอาศัยกระบวนการหมัก หรือกระบวนการหายใจแบบไม่ใช้อากาศ

2.7 การทำเชื้อในรูปผงแห้ง

แต่เดิมการทำเชื้อในรูปผงแห้งมีวัตถุประสงค์เพื่อเก็บรักษาเชื้อไว้ให้ได้นาน ปัจจุบันการทำเชื้อในรูปผงแห้งนอกจากเพื่อการเก็บรักษาแล้วยังทำเพื่อความสะดวกในการจัดเก็บ การขนส่งและการนำไปใช้ ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมามีวิธีการทำแห้งเชื้อหลายวิธี ได้แก่ การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Drying) การทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray Drying) และการทำแห้งแบบฟลูอิไดซ์ (Fluidized Bed Drying) เป็นต้น (Morgan, et al., 2006)

การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Drying) นิยมใช้ในการเก็บรักษาหัวเชื้อ (Yang, Ma and Zhang, 2007; Miyamoto-Shinohara, et al., 2001; Ndoye, et al., 2007; Zhao and Zhang, 2009; Ampatzoglou, et al., 2010; Abadiaset, et al., 2001; Palmfeldt, Radstrom and Hahn-Hagerdal, 2003) รวมทั้งการเก็บรักษาเชื้อของ American Type Culture Collection (ATCC) หรือ การเก็บรักษาหัวเชื้อในประเทศไทยโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Thailand Institute of Scientific and Technological Research : TISTR) เป็นต้น การทำแห้งด้วยวิธีนี้ทำได้ง่าย ราคาไม่สูงมากนักสำหรับการเก็บเป็นหัวเชื้อ สะดวกในการขนส่งและการนำไปใช้ แต่ไม่เหมาะสมในการผลิตปริมาณมากเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเนื่องจากยังมีต้นทุนค่อนข้างสูง

การทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray Drying) เป็นการทำแห้งเชื้ออีกวิธีหนึ่งที่ทำได้ง่ายและราคาถูกกว่าการทำแห้งแบบเยือกแข็ง สามารถผลิตผงเชื้อได้ปริมาณมากโดยใช้เวลาน้อย แต่เนื่องจากการทำแห้งด้วยวิธีนี้ต้องใช้ลมร้อนที่อุณหภูมิสูง (มากกว่า 100 องศาเซลเซียส) ทำให้ได้ปริมาณเซลล์รอดชีวิตน้อยและเซลล์ได้รับบาดเจ็บจากความร้อนเป็นจำนวนมาก การทำแห้งด้วยวิธีนี้จึงเหมาะสมกับเชื้อ บางชนิดที่สามารถทนความร้อนได้ดีและจำเป็นต้องใช้สารป้องกันเซลล์ร่วมด้วย (Ananta, Volkert and Knorr, 2005; Meng, et al., 2008)

การทำแห้งด้วยวิธีการอบแห้งแบบถาด (Tray Drying) เป็นวิธีทำแห้งแบบง่ายที่นิยมใช้ในการทำแห้งผักและผลไม้ โดยใช้ลมร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส (Das, et al., 2001) วิธีนี้อาจไม่เป็นที่นิยมในการทำแห้งเชื้อ เนื่องจากต้องใช้เวลาสัมผัสความร้อนเป็นเวลานาน แต่สำหรับเชื้อบางชนิดที่สามารถทนร้อนได้ หรือสามารถสร้างสปอร์ได้ การทำแห้งด้วยวิธีนี้อาจเป็นวิธีที่ช่วยลดต้นทุนการผลิตเชื้อผงได้

2.8 รายงานการทำ *Bacillus* ในรูปผงแห้ง

รายงานการทำ *Bacillus* ในรูปผงแห้งมีเพียงเล็กน้อย ได้แก่ การทำแห้ง *Bacillus thuringiensis* และ *Bacillus coagulans* วิธีการทำแห้งที่ใช้ ได้แก่ การทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray Drying) การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Drying) และแบบเตาอบ (Oven Drying)

Xueyonga, et al. (2008) ศึกษาทำแห้ง Spores ของ *Bacillus thuringiensis* เมื่อเพิ่มอุณหภูมิ Inlet และOutlet ทำให้การรอดของสปอร์ลดลง และอิทธิพลของ Outlet มีผลทำลาย สปอร์มากกว่า Inlet เมื่อ Inlet 155 ถึง 165 องศาเซลเซียส Outlet 66 ถึง 70 องศาเซลเซียส จำนวนสปอร์ใกล้เคียงกับที่ได้จากการทำ Freeze Drying ส่วนจำนวนสปอร์ที่ได้จาก Oven Drying น้อยกว่าที่ได้จาก Freeze Drying และ Spray Drying

Yadav, Chaudhari and Kothari (2009) ได้ศึกษาการ Spray Drying ของ *Bacillus coagulans* ที่อุณหภูมิ Air Inlet 180 ± 1 องศาเซลเซียส, Air Pressure 2.5 kg/cm^2, Flow Rate 25 ml/min และอุณหภูมิ Outlet 90 ± 1 องศาเซลเซียส พบการใช้สารป้องกันเซลล์ได้แก่ Maltodextrin ทำให้เซลล์รอดชีวิตเพียง 0.24 เปอร์เซ็นต์, Calcium Lactate ทำให้เซลล์รอดชีวิต 73 เปอร์เซ็นต์, Trehalose 54 เปอร์เซ็นต์, Re-Skim Milk 79 ถึง 87 เปอร์เซ็นต์ ส่วนโซเดียมคลอไรด์ และGum Acacia ไม่ช่วยปรับปรุงการรอดชีวิต

2.9 การทำเชื้อในรูปผงแห้งด้วยวิธีการอบแห้งแบบถาด (Tray Drying)

2.9.1 กลไกการทำแห้ง

ความร้อนภายในตู้อบจะถูกถ่ายเทไปยังผิวของตัวอย่างเปียกที่ประกอบด้วยเชื้อผสมสารตัวกลางและน้ำ น้ำจะระเหยออกมาด้วยความร้อนแฝงของการเกิดไอ สภาวะดังกล่าวจะทำให้ความดันไอที่ผิวหน้าของตัวอย่างต่ำกว่าความดันไอด้านใน เป็นผลให้เกิดความแตกต่างของความดันไอน้ำ ภายในตัวอย่างชั้นด้านในจะมีความดันไอสูงและค่อย ๆ ลดต่ำ ความแตกต่างนี้ทำให้เกิดแรงดันเพื่อไล่น้ำออกจากตัวอย่างที่มีเชื้อผสมอยู่ (Foust, et al., 1980; Geankoplis, 2003; Mccabe, Smith and Harriott, 2001) อาจแบ่งกลไกการทำแห้งได้เป็น 3 ระยะคือ

2.9.1.1 ระยะการปรับสภาวะเบื้องต้น (Initial Adjustment Period) เป็นช่วงที่ความชื้นที่มีอยู่ในตัวอย่างปรับตัวเพื่อมีอุณหภูมิเท่ากับอากาศร้อน อัตราการแห้งจะต่ำและจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงช่วงที่อัตราการอบแห้งคงที่

2.9.1.2 ระยะอัตราการแห้งคงที่ (Constant Rate Period) เป็นช่วงที่น้ำในตัวอย่างระเหยเป็นไออย่างต่อเนื่อง คล้ายกับการระเหยของน้ำโดยทั่วไป

2.9.1.3 ระยะอัตราการอบแห้งลดลง (Falling Rate Period) เป็นช่วงที่ความชื้นในตัวอย่างเหลือน้อย จนแพร่ไปยังผิวหน้าตัวอย่างไม่ต่อเนื่อง ทำให้ชั้นของเหลวที่ปกคลุมอยู่ไม่สม่ำเสมอ อัตราการแห้งจึงลดลง และเมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้น ความชื้นจะลดลงเรื่อย ๆ จนถึงความชื้นสมดุล ซึ่งน้ำในตัวอย่างไม่สามารถระเหยออกมาได้อีก

2.9.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำเชื้อในรูปผงแห้งด้วยวิธีการอบแห้งด้วยวิธี Tray Drying

2.9.2.1 อุณหภูมิในการทำแห้ง

ปกติอุณหภูมิในการอบแห้งด้วยวิธีการอบแห้งแบบถาดจะต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส การทำแห้งด้วยลมร้อน ถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไปจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความชื้นสูงเกินไป (Mauriello, et al., 1999) แต่การทำแห้งที่อุณหภูมิสูงเกินไป อาจทำให้ผลิตภัณฑ์เสียหายได้ (Gardiner, et al., 2002)

2.9.2.2 สารตัวกลาง

สารตัวกลางเป็นสารที่ใช้ผสมกับผลิตภัณฑ์จากเซลล์หรือเซลล์ที่ต้องการทำแห้ง เพื่อป้องกันไม่ให้ผลิตภัณฑ์หรือเซลล์สัมผัสกับความร้อนโดยตรง อีกทั้งเป็นการเพิ่มมวลให้กับผลิตภัณฑ์อีกด้วย ตัวอย่างของสารตัวกลางที่นิยมใช้ คือ สารประเภทคาร์โบไฮเดรตหรือโปรตีน ได้แก่ Lactose, Sucrose, Mannitol, Cyclodextrin, Dextrin และSkim Milk เป็นต้น (Millqvist-Fureby, Malmsten and Bergenstahl, 1999; Sunny-Roberts and Knorr, 2009)

2.9.2.3 สารป้องกันเซลล์

ในการทำแห้งเซลล์ด้วยความร้อนอาจจำเป็นต้องใส่สารป้องกันเซลล์ซึ่งมีสมบัติในการปกป้องเซลล์จากกระบวนการทำแห้งได้ ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพิ่มมากขึ้น สารป้องกันเซลล์มีหลายประเภท ตัวอย่างสารป้องกันเซลล์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ Maltodextrin, Dextrin น้ำตาลซูโครส, Tween 80 และวิตามินบางชนิด เป็นต้น (Morgan, et al., 2006; Meng, et al., 2008)