บทที่ 1
บทนำ

เมืองไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งตามหมู่บ้านในชนบทเกษตรกรยังนิยมเลี้ยงสัตว์ไว้เพื่อบริโภคเองในครัวเรือน หรือเป็นฟาร์มขนาดเล็ก สุกรจัดเป็นสัตว์เศรษฐกิจ เนื่องจากได้รับความนิยมในการบริโภคเป็นอันดับสอง รองจากไก่ ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้อัตราการเลี้ยงเพิ่มขึ้น ปัญหาในการเลี้ยงสุกรที่พบมากที่สุดและถือเป็นช่วงวิกฤตได้แก่สุกรช่วงเล็ก (นวลจันทร์ และนันทวัน, 2545) ได้แก่ปัญหาโรคท้องร่วงซึ่งพบในสุกรทุกแหล่ง โดยเฉพาะแหล่งที่เลี้ยงในเชิงอุตสาหกรรม สาเหตุหนึ่งเกิดจากสุกรติดเชื้อ *Salmonella* spp. และ Enteropathogenic *Escherichia coli* เนื่องจากสุกรในช่วงแรกเกิดจนถึงหย่านมมีโอกาสสูงในการรับเชื้อเหล่านี้มาจากแม่โดยตรง หรือจากเชื้อที่สะสมในคอก แม้กระทั่งการเปลี่ยนสภาพแวดล้อมในเรื่องของอุณหภูมิ ความชื้น อาหาร ทำให้เกิดการติดเชื้อได้ทั้งสิ้น อาการโรคท้องร่วงที่มีการป่วยเรื้อรังอาจเกิดจากการติดเชื้อแทรกซ้อน ทำให้การเจริญเติบโตชะงัก แคระแกร็น ส่งผลถึงการผลิตและสมรรถนะการเจริญในระยะขุนได้ ส่วนในการเลี้ยงสัตว์ปีกนั้น การติดเชื้อก่อโรคท้องร่วงนี้เป็นปัญหาที่พบในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีกเช่นกัน โดยมีสาเหตุมาจากการติดเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Salmonella* spp. และ *Campylobacter* spp. (ธวัชชัย และคณะ, 2547) ทำให้สัตว์มีอาการไข้ ซึม ท้องร่วง ส่งผลให้ผลผลิตลดลง และถ้ามีอาการรุนแรงอาจทำให้สัตว์ตายได้

ที่ผ่านมานั้นในทางปฏิบัติเกษตรกรนิยมใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสุกรและสัตว์ปีกเพื่อป้องกันการติดเชื้อและเป็นการกระตุ้นการเจริญโดยจะให้ยาในปริมาณที่ต่ำกว่าระดับที่ใช้รักษา (sub-therapeutic dose) ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะในระดับนี้เป็นระยะเวลานานนั้นทำให้เชื้อแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดเริ่มดื้อต่อยาทำให้ต้องเพิ่มปริมาณยาที่ใช้ ก่อให้เกิดการสิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และยาปฏิชีวนะอาจตกค้างในเนื้อสัตว์และส่งผลกระทบโดยตรงต่อผู้บริโภค (ธวัชชัย และคณะ, 2547; Yen et al., 1987; De Angelis et al., 2006) นอกจากนี้การใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์กลายเป็นประเด็นทางการค้าที่ประเทศคู่ค้าจำเป็นต้องปฏิบัติตามในการถอนยาวนะปฏิชีต้องห้ามทั้งหมด เนื่องจากในปี ค.ศ. 2002 สมาพันธ์สหภาพยุโรปได้ออกข้อกำหนดห้ามนำเข้าเนื้อสัตว์ที่ผลิตจากฟาร์มที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะในระดับ sub-therapeutic dose ประเทศไทยในฐานะประเทศที่มีการส่งออกผลิตภัณฑ์เกษตรเป็นอันดับต้นๆของโลก จำเป็นต้องปรับปรุงแก้ไขระบบการผลิตเพื่อให้เป็นที่ยอมรับแก่ประเทศคู่ค้าและผลิตเนื้อสัตว์ที่ปลอดภัยแก่ผู้บริโภค

ทางเลือกหนึ่งซึ่งเริ่มถูกนำมาใช้ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และส่งเสริมภูมิคุ้มกันให้แก่สัตว์ได้แก่ การนำเอาแบคทีเรียโปรไบโอติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้จากธรรมชาติ ซึ่งมีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร มาผสมลงในอาหารหรือน้ำที่ใช้เลี้ยงสัตว์ โดยเชื้อโปรไบโอติกจะเป็นแบคทีเรียที่ไม่มีอันตรายมาแข่งขันกับแบคทีเรียก่อโรคท้องร่วงเพื่อที่จะเป็นประชากรเด่นแย่งพื้นที่ในการเกาะติดผนังลำไส้ของเชื้อก่อโรค ทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญและเพิ่มจำนวนได้นอกจากนี้

แบคทีเรียโปรไบโอติกสามารถสร้างกรดอินทรีย์ออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคที่ไม่ทนกรด ซึ่งกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียกลุ่มโปรไบโอติกสร้างได้แก่ กรดแลคติก อะซิติก โพรพิโอนิก ฟอร์มิก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารที่มีสมบัติทางปฏิชีวนะ ในกลุ่มแบคเทอริโอซินส์ (bacteriocins) ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียในลำไส้ที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วง เช่น *Salmonella*, *Shigella*, enteropathogenic *Escherichia coli* ฯลฯ ได้ด้วย เช่น niacin เป็นต้น (Jack et.al.,1995)

อนึ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ประชาชนนอกจากนิยมบริโภคข้าวเหนียวเป็นอาหารหลักแล้ว ยังนิยมบริโภคขนมจีนอีกด้วย ทำให้มีโรงงานผลิตเส้นขนมจีนขนาดเล็กหลายโรงงาน ซึ่งน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนจะมีแป้งข้าวจ้าวปนอยู่ด้วย จากเหตุการณ์ที่โรงงานผลิตเส้นขนมจีนปล่อยน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำชุมชน ทำให้เกิดปัญหาน้ำเน่าเสีย เนื่องจากในน้ำทิ้งนั้นมีแป้งปนเปื้อนมาด้วย และจุลินทรีย์ในแหล่งน้ำนั้น สามารถนำแป้งไปใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานในการเจริญได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้มีแนวคิดที่จะนำน้ำที่เหลือทิ้งจากการต้มเส้นขนมจีนมาใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก เพื่อนำมาใช้ผสมในอาหารสัตว์หรือน้ำที่ให้สัตว์กิน เพื่อช่วยให้สัตว์เติบโตดี มีภูมิต้านทานต่อโรคติดเชื้อทางเดินอาหาร และยังได้ประโยชน์ในการลดปริมาณน้ำทิ้งจากโรงงานขนมจีนที่จะปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อมด้วย

งานวิจัยในครั้งนี้เป็นการวิจัยต่อยอดจากโครงการวิจัยในหัวข้อเรื่อง การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายแป้งในน้ำทิ้งจากการต้มเส้นขนมจีนและบทบาทการเป็นโปรไบโอติกส์สำหรับอาหารสุกร ของปีงบประมาณ ๒๕๕๒ ซึ่งคัดเลือกได้เชื้อ *Lactobacillus* SK5 ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส์ที่ดี มาเพาะเลี้ยงในน้ำที่เหลือทิ้งจากกระบวนการต้มเส้นขนมจีนร่วมกับเชื้อ *Bacillus coagulans* NF17 ซึ่งผลิตเอนไซม์อไมเลสย่อยสลายแป้งไปเป็นน้ำตาลได้ดี โดยน้ำตาลที่ได้จะเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองชนิดดังกล่าว โดยการวิจัยครั้งนี้จะได้ทำการถ่ายทอดขั้นตอนและวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง ๒ ชนิดดังกล่าวในน้ำที่เหลือทิ้งจากกระบวนการต้มเส้นขนมจีนให้แก่กลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงสุกร รวมถึงวิธีการใช้เชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกเป็นอาหารเสริมแทนยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสุกร

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาอุณหภูมิและค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเชื้อโปรไบโอติก: *Lactobacillus* SK5
2. จำแนกระบุสปีชีส์ของเชื้อโปรไบโอติก: *Lactobacillus* SK5
3. ศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติก: *Lactobacillus* SK5 ในน้ำต้มเส้นขนมจีนแบบควบคุมและไม่ควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยง
4. ศึกษารูปแบบที่เหมาะสมของหัวเชื้อโปรไบโอติก: *Lactobacillus* SK5
5. ถ่ายทอดวิธีการผลิตและการใช้เชื้อโปรไบโอติก: *Lactobacillus* SK5 ในการเลี้ยงสุกร

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. เน้นโปรไบโอติก ที่ใช้กับสุกรเพื่อป้องกันโรคท้องร่วง
2. เน้นอบรมให้ผู้เลี้ยงสุกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทางเลือกในการแก้ปัญหาน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเส้นขนมจีนก่อปัญหาเน่าเสียในชุมชนและสิ่งแวดล้อม
2. เกษตรกรเรียนรู้ถึงความเป็นไปได้ในการนำเอาของเหลือทิ้งใกล้ตัวมาใช้ประโยชน์
3. เกษตรกรเรียนรู้ถึงแนวทางใหม่ในการเลี้ยงสัตว์โดยไม่ต้องพึ่งยาปฏิชีวนะ
4. ลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสุกรและสัตว์ปีก อันจะส่งผลให้เชื้อโรคมีโอกาสดื้อยาและลดการเกิดยาปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อสัตว์
5. เกิดความร่วมมือกันระหว่างโรงงานผลิตขนมจีนและเกษตรกรในชุมชนนั้น

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โปรไบโอติก (probiotics) มีรากศัพท์มาจากภาษากรีกซึ่งแปลกว่า “เพื่อชีวิต” (for life) และได้นำมาใช้เพื่อหมายถึงจุลินทรีย์ชนิดเดียวหรือจุลินทรีย์เชื้อผสม ซึ่งเมื่อนำไปเสริมในอาหารให้แก่คนและสัตว์จะมีประโยชน์ต่อคนและสัตว์นั้น 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)

คุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (Williams et. al., 1989)

ลักษณะของเชื้อ *Lactobacillus* : เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ มีลักษณะเป็นแท่งสั้นๆ เป็น facultative anaerobes พบอาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ แยกได้จากทางเดินอาหาร ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ยังพบบริเวณช่องคลอดอีกด้วย เจริญได้ในสภาวะกรด แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญและผลิตกรดแลคติกได้มากกว่าร้อยละ 85 ในการหมักแบบ homofermentative หรือได้กรดแลคติกร้อยละ50 คาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล และกรดแอซีติก ในการหมักแบบ heterofermentative เจริญได้ที่พีเอช 4.0-4.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 30-40 องศาเซลเซียส

การทำงานของแบคทีเรียโปรไบโอติก (Fuller, 1989)

1. ทำให้ pH ของอาหารลดลง การลดลงของ pH และเกิดกรดอินทรีย์มาจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกรดแลคติก จะให้กรดอินทรีย์ คือ กรดแลคติก และ กรดอะซิติก เป็นสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ ทำให้ pH ของซับสเตรทต่ำลงความเป็นกรดสูงและ pH ต่ำ สร้างกรดแลคติกทำให้ pH ของอาหารลดลง ส่งให้ระบบทางเดินอาหารมีความเป็นกรดที่เหมาะสมต่อสภาวะการย่อยอาหาร และช่วยยับยั้งการเจริญแบคทีเรียที่เป็นโทษ

2. แย่งพื้นที่จับกับเยื่อบุผนังลำไส้เล็ก โดยจะเข้าเกาะผนังภายในระบบทางเดินอาหาร ป้องกันแบคทีเรียที่เป็นโทษเข้าเกาะทำลายผนังระบบทางเดินอาหาร ซึ่งจะช่วยทำให้การย่อยและการดูดซึมอาหารเป็นไปตามปกติ

3. สร้างสารบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อโรค โดยสารนี้เรียกว่าแบคเทอริโอซินส์ (bacteriocin)

4. ผลิตสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นที่รู้โดยทั่วกันว่า H_2O_2 เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้าง H_2O_2 สารนี้ทำหน้าที่เป็นตัวรับออกซิเจน เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีเอนไซม์ฟลาโวโปรตีนออกซิเดส แต่ขาดเอนไซม์คะตาเลส เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกสร้าง H_2O_2 จึงทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกทนต่อ H_2O_2 มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถใช้เป็นโปรไบโอติก จะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (GRAS = Generally Reccommignized As Safe) ต่อมนุษย์และสัตว์ เช่น มีการพิสูจนีแล้วว่าไม่เป็นเชื้อโรค และต้องให้ผลดีกว่าไม่เติมโปรไบโอติกสำหรับมนุษย์และสัตว์

Du Toit. และคณะ (1998) ทำการคัดแยกแบคทีเรียในกลุ่ม lactobacilli ที่มีศักยภาพเป็นเชื้อโปรไบโอติกจากมูลสุกรเพื่อนำไปใช้เป็นสารเสริมในอาหารสำหรับลูกสุกร โดยทำการคัดแยกบนพื้นฐานที่ว่าแบคทีเรียสามารถสร้าง antibacterial substances, ทน pH ที่เป็นกรดได้ ทนน้ำดี (bile salts) ได้ แล้วทำการบ่งชี้ไอโซเลทที่คัดแยกได้ด้วยวิธี DNA-DNA hybridization จากนั้นนำไอโซเลทที่บ่งชี้ว่าเป็นเชื้อ *Lactobacillus reuteri* 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 ต้องทนสภาวะที่มีน้ำดี ทนสภาพแวดล้อมที่มี 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 โดยพบว่าหลังจากหยุดให้อาหารผสมเชื้อโปรไบโอติกจะพบว่าเชื้อมีจำนวน

ลดลงและนอกจากนี้ยังพบว่าระหว่างที่มีการให้อาหารผสมเชื้อโปรไบโอติก 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 และรองลงมาคือกลุ่มที่รับ 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) คัดแยกได้เชื้อ *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 โดย กลุ่มที่ 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 x 10^5, 2.2 x 10^6 และ 2.2 x 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) พร้อมทั้งศึกษาความสามารถในการรอดชีวิต หลังผ่านระบบทางเดินอาหารและการคงอยู่หลังหยุดให้อาหารผสมเชื้อแบคทีเรีย 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

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่เชื้อ *Bacillus coagulans* NF17 ซึ่งได้จากโครงการวิจัยการผลิตกรดแลคติกจากเชื้อแบคทีเรียทนร้อน (ดาราวรรณ และเสาวนิต, 2548) และเชื้อโปรไบโอติก *Lactobacillus* sp. strain SK5 ซึ่งแยกและคัดเลือกได้จากโครงการวิจัยนี้ในปีที่ 1

3.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท SK 5

3.1.1. เตรียม inoculum ของเชื้อไอโซเลท SK 5ลงใน MRS broth บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.1.2. ปิเปต inoculum ของเชื้อไอโซเลท SK 5 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร MRS broth ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตรบรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ กัน ได้แก่ที่ 23, 30, 35, 42, และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.1.3. เก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวัดความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่ 0 จนถึงวันที่ 3 บันทึกผลการทดลองและเขียนกราฟการเจริญของเชื้อ SK5

3.2 การศึกษาความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท SK 5

3.2.1 เตรียม inoculum ของเชื้อไอโซเลท SK 5ลงใน MRS broth บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.2 ปิเปตเชื้อ SK 5 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงอาหาร MRS broth ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ กัน ได้แก่ pH 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, และ 10 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

3.2.3 เก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวัดความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยทำการเก็บตัวอย่างตั้งแต่วันที่ 0 จนถึงวันที่ 3 บันทึกผลการทดลองและเขียนกราฟการเจริญของเชื้อ SK5

3.3 ศึกษาระบุชนิด (species) ของเชื้อ *Lactobacillus* SK5

3.3.1 โดยใช้ conventional methods ตาม Bergey's manual of systematic bacteriology โดยอาศัยคุณสมบัติทาง morphology, physiology และ biochemical tests

3.3.2 โดยใช้ commercial test kits: API 50CHL (BioMerieux, France)

3.4 ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโปรไบโอติกในน้ำต้มเส้นขนมจีนแบบควบคุมและไม่ควบคุมสภาวะ อันได้แก่ pH และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง

3.4.1 เตรียมน้ำต้มเส้นขนมจีนในฟลาสก์ โดยใส่ฟลาสก์ละ 90 ml/250 ml flask ในการทดลองผลของ pH ต่อการเจริญจะเติม 0.5% $CaCO_3$ ลงไป จากนั้นนำไป sterile ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมนม UHT 10% ก่อนทำการ inoculate เชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก

3.4.2 เตรียมเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก *Lactobacillus* SK5 โดย streak ลงบนอาหาร MRS ที่เติม 0.5% $CaCO_3$ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2 วัน ในขณะที่ *Bacillus coagulans* NF17 streak ลงบนอาหาร GYP ที่เติม 0.5% $CaCO_3$ บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 2 วัน

3.4.3 แบ่งการทดลองเป็น 4 ชุดการทดลองดังนี้ ชุดที่ 1 เติม 0.5% $CaCO_3$ บ่มที่อุณหภูมิ 45°C ชุดที่ 2 ไม่เติม 0.5% $CaCO_3$ บ่มที่อุณหภูมิ 45°C ชุดที่ 3 เติม 0.5% $CaCO_3$ บ่มที่อุณหภูมิห้อง และชุดที่ 4 เติม 0.5% $CaCO_3$ บ่มที่อุณหภูมิห้อง หลัง inoculate เชื้อ *B. coagulans* NF17 ลงไปฟลาสก์ละ 2 loopful แล้วนำไปตรวจนับจำนวนเชื้อเริ่มต้นด้วยวิธีการ plate count technique บนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 45°C จากนั้นนำฟลาสก์ไปแยกบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังที่กล่าวและแสดงในตารางด้านล่างนี้ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเชื้อหลังเพาะเลี้ยงไปหนึ่งวัน

ตารางที่ 1 Treatments ในการทดสอบผลของ pH และอุณหภูมิ ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus coagulans* NF17 เพื่อให้ทำหน้าที่ย่อยสลายแป้งในน้ำต้มเส้นขนมจีน

1. คุม pH และคุมอุณหภูมิ	2. ไม่คุม pH และคุมอุณหภูมิ	3. คุม pH ไม่คุมอุณหภูมิ	4. ไม่คุม pH ไม่คุมอุณหภูมิ
$CaCO_3$-NF17-45°C	NF17-45°C	$CaCO_3$-NF17-RT	NF17-RT

3.4.4 หลังจากเลี้ยงเชื้อ *B. coagulans* NF17 ในน้ำต้มเส้นขนมจีนเพื่อให้เชื้อนี้ย่อยแป้งในน้ำต้มเส้นขนมจีน เปลี่ยนเป็นน้ำตาลเป็นเวลาหนึ่งวัน จากนั้น inoculate เชื้อ *Lactobacillus* SK5 ลงไปฟลาสก์ ละ 2 loopful (ตรวจนับจำนวนเชื้อ SK5 เริ่มต้นด้วยวิธี plate count technique บน MRS agar ที่เติม 0.5% $CaCO_3$ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C) นำไปแยกบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังที่กล่าวและแสดงในตารางด้านล่างนี้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเชื้อหลังเพาะเลี้ยงไปหนึ่งวัน

ตารางที่ 2 Treatments ในการทดสอบผลของ pH และอุณหภูมิ ที่มีต่อเชื้อ *Lactobacillus* SK5 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำต้มเส้นขนมจีนที่ผ่านการย่อยสลายแป้งด้วยเชื้อ *Bacillus coagulans* NF17 มาแล้ว 1 วัน

1. คุม pH และคุมอุณหภูมิ	2. ไม่คุม pH และคุมอุณหภูมิ	3. คุม pH ไม่คุมอุณหภูมิ	4. ไม่คุม pH ไม่คุมอุณหภูมิ
$CaCO_3$-NF17-45°C	NF17-45°C	$CaCO_3$-NF17-RT	NF17-RT

3.5 ศึกษาเปรียบเทียบแบคทีเรียในรูปเชื้อผงแห้ง (lyophilized form) และในรูปเชื้อสดบนอาหารวุ้นเอียง (agar slant) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ (inoculum) ในการหมักน้ำต้มเส้นขนมจีน

3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อผงแห้ง

3.5.1.1 เลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* SK5 ในบนอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในขณะที่ *B. coagulans* NF17 เลี้ยงในอาหาร GYP broth บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาในการบ่มนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเซลล์ที่ 5000 rpm, 4°C เป็นเวลา 20 นาที่ และล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย normal saline solution นำไปวัดความขุ่นของเซลล์ที่ OD600 nm จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ OD600nm ประมาณ 3.0 (10^{10} CFU/ml) ใน 10% skim milk solution

3.5.1.2 บรรจุ cell suspension ปริมาตร 1 มล. ใส่ใน sterile vial จากนั้นนำไปทำ shelf freeze ใน 95%alcohol ที่นำไปแช่ใน -80°C ล่วงหน้าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเข้าไปเก็บใน -80°C ประมาณ 5 นาทีเมื่อ cell suspension แข็งแล้วนำออกมาเก็บในภาชนะที่แห้งก่อนเก็บที่ -80°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อสดบนอาหารวุ้นเอียง

streak เชื้อ *Lactobacillus* SK5 ลงบนอาหาร MRS slant ที่เติม 0.5% $CaCO_3$ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 2 วัน ในขณะที่ *Bacillus coagulans* NF17 streak ลงบนอาหาร NA slant บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 2 วัน

3.5.3 ศึกษาการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำต้มเส้นขนมจีนโดยใช้หัวเชื้อสด และเชื้อผงแห้ง

3.5.3.1 นำขวดสะอาดขนาด 1.5 ลิตรมาบรรจุน้ำต้มเส้นขนมจีนลงไป 2/3 ของปริมาตรขวด (~ 900 มล.) และเติมนม UHT 100 มล. แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุดการทดลอง

3.5.3.2 ชุดการทดลองที่ 1 นำน้ำต้มเส้นขนมจีนที่ผสมนม UHT มาเติมหัวเชื้อ *B. coagulans* NF17 จาก NA slant บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมงจากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้องจนครบ 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักไปวัดค่า pH และตรวจนับจำนวนเชื้อ *B. coagulans* NF17 ด้วยวิธี plate count technique บนอาหาร nutrient agar (NA) แล้วทำการเติมหัวเชื้อ *Lactobacillus* SK5 จาก MRS slant บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักไปวัดค่า pH และตรวจนับจำนวนเชื้อ *Lactobacillus* SK5 ด้วยวิธี plate count technique บนอาหาร MRS agar ที่เติม 0.5% $CaCO_3$

3.5.3.3 ชุดการทดลองที่ 2 นำน้ำต้มเส้นขนมจีนที่ผสมนม UHT มาเติมเชื้อผงแห้ง *B. coagulans* NF17 บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมงจากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้องจนครบ 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักไปวัดค่า pH และตรวจนับจำนวนเชื้อ *B. coagulans* NF17 ด้วยวิธี plate count technique บนอาหาร nutrient agar (NA) แล้วทำการเติมเชื้อผงแห้ง *Lactobacillus* SK5 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักไปวัดค่า pH และตรวจนับจำนวนเชื้อ *Lactobacillus* SK5 ด้วยวิธี plate count technique บนอาหาร MRS agar ที่เติม 0.5% $CaCO_3$

3.6 จัดอบรมและทำคู่มือแนะนำการเพาะเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกให้กับเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการ

3.6.1 ติดต่อผู้ใหญ่บ้าน/ผู้นำชุมชนที่มีลูกบ้าน/สมาชิกที่เลี้ยงสุกรซึ่งต้องการได้รับการอบรมเพื่อนำความรู้ไปใช้ในการเลี้ยงสุกร

3.6.2 จัดทำเอกสารประกอบการอบรม แผ่นพับแนะนำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโปรไบโอติกและการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกเสริมในอหารสุกร รวมถึงแบบประเมินการฝึกอบรม

3.6.3 จัดอบรมยังแหล่งที่อยู่ของเกษตรกร วิเคราะห์ผลประเมินการจัดฝึกอบรม

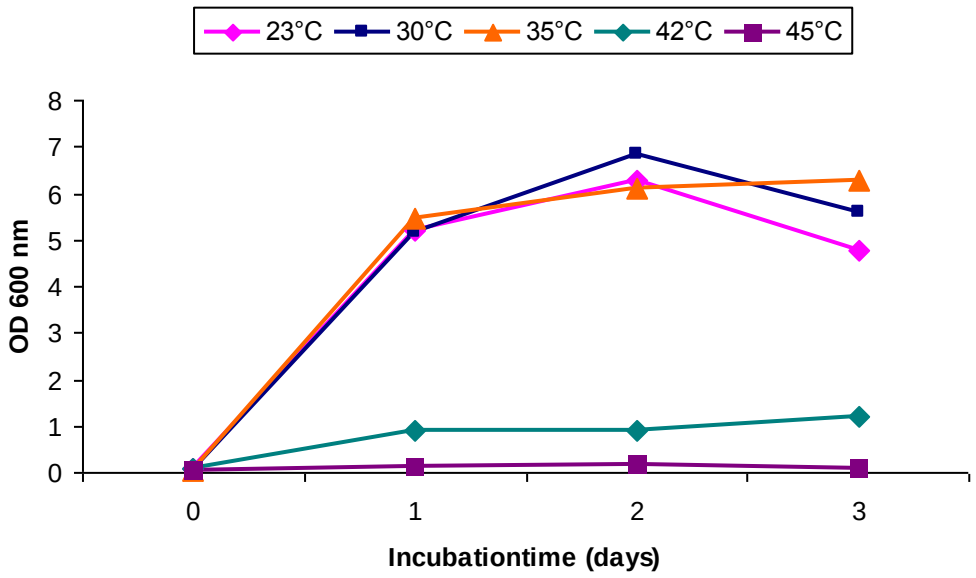
บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท SK5

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อโดยเพาะเลี้ยงเชื้อใน MRS broth โดยแปรผันอุณหภูมิต่าง ๆ กันที่ 23, 30, 35, 42, และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันและตรวจวัดการเจริญของเชื้อจากค่าความขุ่นของเชื้อที่ OD 600 nm โดยผลดังแสดงในตารางที่ 3 และ รูปที่ 1

ตารางที่ 3 ความขุ่น (OD 600 nm) ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SK5 เมื่อเพาะเลี้ยงใน MRS medium ที่อุณหภูมิ 23, 30, 35, 42, และ 45 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิ	OD 600			
	วันที่ 0	วันที่1	วันที่2	วันที่3
23°C	0.77	5.19	6.26	4.78
30°C	0.39	5.15	6.86	5.6
35°C	0.06	5.47	6.09	6.28
42°C	0.86	0.9	0.91	1.20
45°C	0.04	0.13	0.15	0.09



รูปที่ 1 ค่า OD_{600} ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SK5 เพาะเลี้ยงใน MRS medium ที่อุณหภูมิ 23, 30, 35, 42, และ 45 องศาเซลเซียส

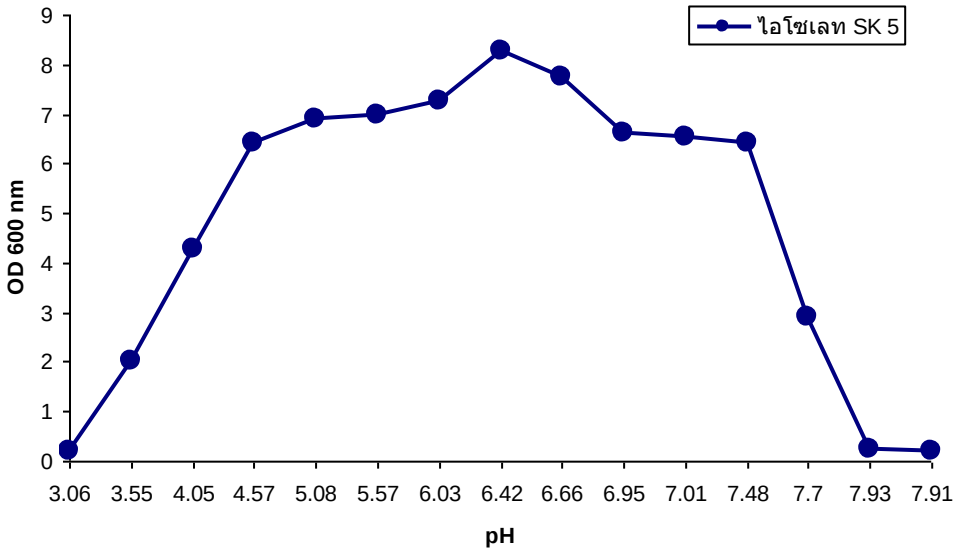
ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้ พบว่าเชื้อ *Lactobacillus* sp. SK5 มี optimum growth temperature ที่ 30°ซ.

4.2 การศึกษาค่า pHที่ เหมาะสมในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท SK5

เมื่อศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ SK 5 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงทำการศึกษาหาค่า pH ที่เหมาะสมโดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหาร MRS broth ที่ปรับ pH ก่อน autoclave แล้วเพาะเลี้ยงเชื้อโดย vary pH จาก 3-10 ซึ่งหลังจาก autoclave อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth แล้วก่อนทำการ inoculation วัด pH ของอาหารพบว่า vary จาก 3.06-7.99 ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 2 ซึ่งพบว่าเชื้อ *Lactobacillus* sp. SK5 เจริญได้ดีที่สุดที่ pH 6.42

ตารางที่ 4 แสดงความขุ่นของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SK5 ใน MRS medium เมื่อเจริญที่ค่า pH แตกต่างกัน

pH ของอาหาร MRS broth	OD_{600}			
	วันที่0	วันที่1	วันที่2	วันที่3
3.06	0.105	0.187	0.206	0.234
3.55	0.092	1.035	2.015	2.310
4.05	0.113	3.335	4.285	4.250
4.57	0.132	5.730	6.413	5.745
5.08	0.121	6.46	6.910	5.850
5.57	0.104	7.380	7.0	6.120
6.03	0.111	7.970	7.270	7.193
6.42	0.105	7.980	8.260	8.573
6.66	0.106	7.720	7.750	6.998
6.95	0.107	6.540	6.623	6.634
7.01	0.060	6.460	6.54	6.60
7.48	0.080	6.370	6.428	6.368
7.70	0.029	2.760	2.888	6.075
7.93	0.103	0.180	0.249	5.485
7.99	0.078	0.188	0.216	4.57



รูปที่ 2 ความขุ่น (OD_{600}) ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. SK5 ใน MRS broth เมื่อเจริญที่ค่า pH แตกต่างกัน

4.3 ศึกษาระบุชนิด (species) ของเชื้อ *Lactobacillus* SK5

4.3.1 โดยใช้ conventional methods

จากการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อไอโซเลท SK5 ได้แก่ การทดสอบทางด้าน Morphology เช่น Colony morphology, Cell morphology และ การทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ catalase test, nitrate reduction test, gelatin liquefaction test ส่วนสุดท้ายทดสอบความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ ซึ่งได้ผลการทดลองดังตารางที่ 5 พบว่า ไอโซเลท SK 5 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส และ สามารถใช้สารประกอบคาร์โบไฮเดรตได้ดังนี้ คือ น้ำตาลแลคโตส, น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรุสโตส และ น้ำตาลแมนโนส ซึ่งเมื่อนำผลการทดสอบที่ได้ไปเปรียบเทียบตารางเพื่อบ่งชี้ species ตามคุณลักษณะที่บรรยายไว้ใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology volume 2 (Williams et. al., 1989) พบว่าไอโซเลส SK 5 มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii*

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบคุณลักษณะของเชื้อไอโซเลท SK 5

การทดสอบ	ผลการทดสอบ
1. Gram strain	+
2. Catalase test	-
3. Gas from glucose	-
4. nitrate reduction test	-
5. gelatin liquefaction test	-
6. Lactose	+
7. Glucose	+
8. Galactose	-
9. Sucrose	-
10. Fructose	+
11. Sorbitol	-
12. Mannose	+
13. Melibiose	-
14. Raffinose	-
15. Xylose	-
16. Arabinose	-
17. Melezitose	-

4.3.2 โดยใช้ commercial test kits

จากการศึกษาจำแนกระบุชนิดของเชื้อไอโซเลท SK5 โดยใช้ API 50CHL test kits (BioMerieux, France) ตามวิธีการที่แนะนำอยู่ในคู่มือของบริษัทบิโอเมริเยร์ ได้ผลการทดลองดังแสดงใน ตารางที่ 6 และรูปที่ 3 เมื่อนำค่าที่ได้ป้อนข้อมูลเข้าสู่โปรแกรม Identification software with database V5.0 ให้ผลออกมาดังรูปที่ 4 ซึ่งระบุว่าเชื้อ ไอโซเลท SK5 มีคุณสมบัติตรงกับเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ถึง 99.9% บนพื้นฐานของการระบุชนิดด้วย API system

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบการใช้น้ำตาลของเชื้อสายพันธุ์ SK5 จากชุดทดสอบ API 50 CH

Test	ผล	หมายเหตุ	Test	ผล	หมายเหตุ
1. Glycerol	-		26. Salicin	+	
2. Erytrol	-		27. D-Cellobiose	+	
3. D-arabinose	-		28. D-Mantose	+	
4. L-Arabinose	-		29. D-Lactose (origine bovine)	+	
5. D-Ribose	+		30. D-Melibiose	+	
6. D-Xylose	-		31. D-Saccharose	+	
7. L-Xilose	-		32. D-Treharose	-	Tests against
8. D-Adonitol	-		33. Inulin	-	
9. Metil-βD-Xylopyranoside	-		34. D-Melezitose	+	
10. D-Galactose	+		35. D-Raffinose	+	
11. D-glucose	+		36. Amidon	-	
12. D-Fructose	+		37. Glycogene	-	
13. D-Mannose	+		38. Xylitol	-	
14. L-Sorbose	-		39. Gentiobiose	-	Tests against
15. L-Rhamnose	-		40. D-Turanose	-	
16. Dulcitol	-		41. D-Lyxose	-	
17. Inositol	-		42. D-Tagatose	-	
18. D-Mannitol	+		43. D-Fucose	-	
19. D-Sorbitol	+		44. L-Fucose	-	
20. Methyl-αD-mannopyranoside	+		45. D-Arabitol	-	Tests against
21. Methyl-αD-glucopyranoside	-		46. L-Arabitol	-	
22. N-acetylglucosamine	+		47. Potassium gluconate	-	
23. Amygdaline	+		48. 2-Ketogluconate	-	
24. Arbutin	+		49. Potassium 5-ketogluconate	-	
25. Esculin citrate	+				

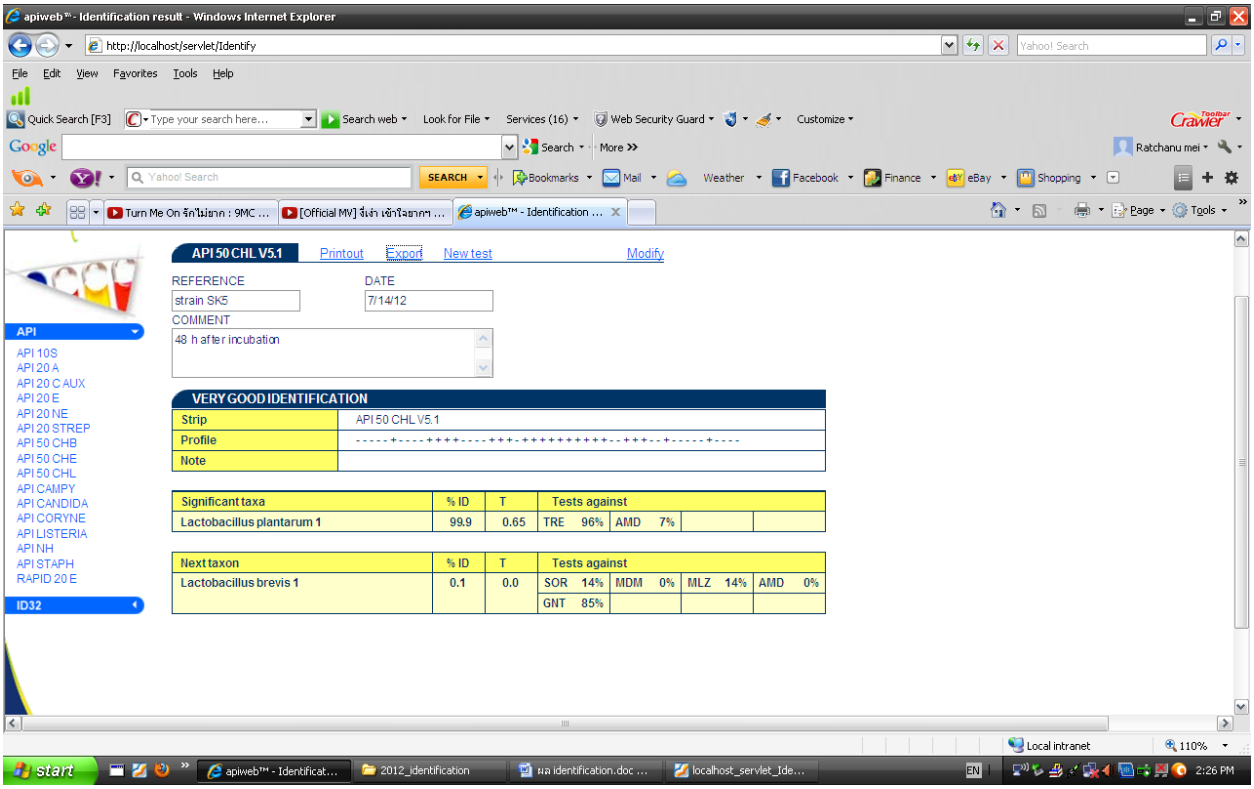
หมายเหตุ:

Tests against คือ ผลที่ได้จากการทดลองตรงกันข้ามกับผลใน database กับเชื้อที่จำแนกได้

\+ คือ ผลการทดสอบเป็นบวก โดย medium เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง (bromcresol purple indicator)

\- คือ ผลการทดสอบเป็นลบ โดย medium ไม่เปลี่ยนสีหรือเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเขียวเท่านั้น

รูปที่ 3 ผลการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อไอโซเลท SK5 โดยใช้ API 50CHL test kit เมื่อบ่มที่ 30°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4 ผลการจำแนกระบุชนิดของเชื้อ *Lactobacilllus* SK5 โดยใช้ API test kit

3.4 ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโปรไบโอติกในน้ำต้มเส้นขนมจีนแบบควบคุมและไม่ควบคุมสภาวะ

3.4.1 ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโปรไบโอติกในน้ำต้มเส้นขนมจีนแบบควบคุมและไม่ควบคุม

จากการทดลองโดยใช้ Treatments ต่างๆ ที่ระบุไว้ในตารางที่ 1 และตารางที่ 2 ของวิธีการทดลองนั้น ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 5

ตารางที่ 7 การเจริญของเชื้อ *B. coagulans* NF17 และ *Lactobacillus* SK5 เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ควบคุมค่า pH ของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อและควบคุมอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ

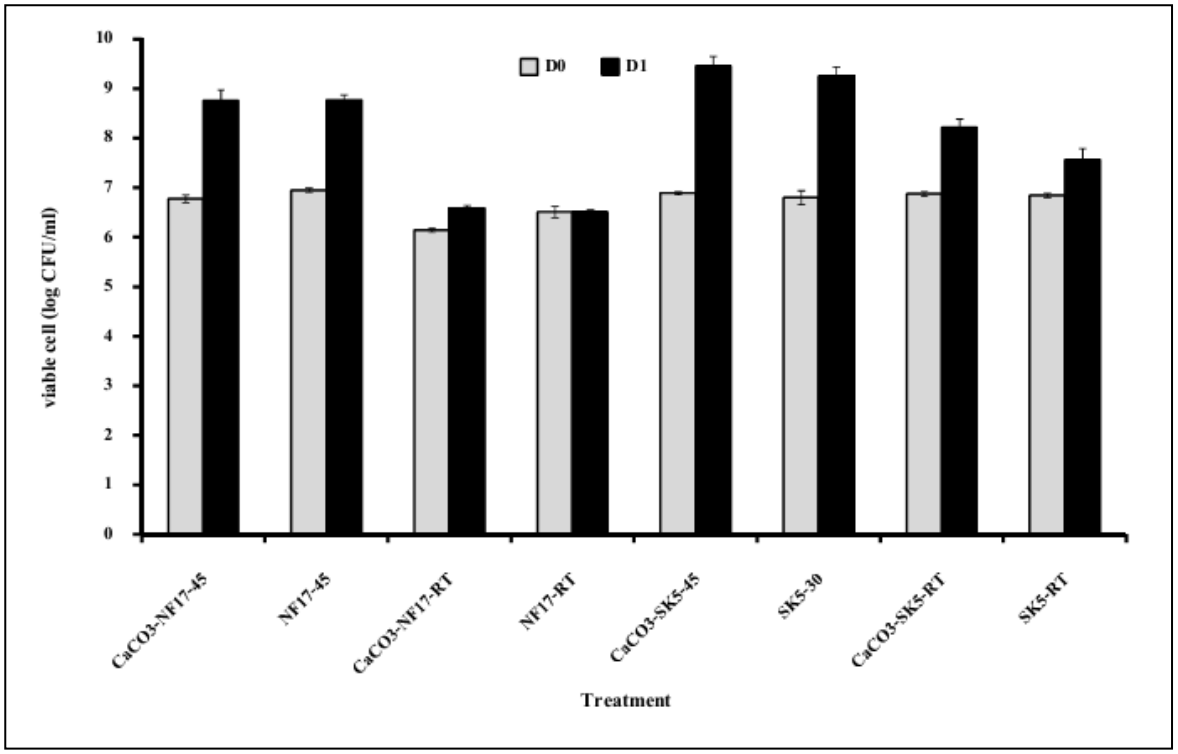
Treatments	**การเจริญของเชื้อที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ของการบ่ม (CFU/ml)**	
	วันที่ 0	**วันที่ 1**
$CaCO_3$-NF17-45°C	6.05×10^6	6.1×10^8
NF17-45°C	9.0×10^6	6.0×10^8
$CaCO_3$-NF17-RT	1.4×10^6	3.85×10^6
NF17-RT	3.3×10^6	3.25×10^6
$CaCO_3$-SK5-30°C	7.8×10^6	3.08×10^9
SK5-30°C	6.5×10^6	1.93×10^9
$CaCO_3$-SK5-RT	7.6×10^6	1.74×10^8
SK5-RT	6.95×10^6	4.0×10^7

พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. coagulans* NF17 น้ำต้มเส้นขนมจีนที่ผสมนม UHT 10% และบ่มที่อุณหภูมิห้อง หลังบ่มครบ 24 ชั่วโมงในชุดที่เติม $CaCO_3$ เชื้อเพิ่มจาก 6.14 log CFU/ml ขึ้นเป็น 6.58 log CFU/ml ในขณะที่ชุดที่ไม่เติม $CaCO_3$ เชื้อเพิ่มจาก 6.50 log CFU/ml ขึ้นเป็น 6.51 log CFU/ml จากข้อมูลนี้แสดงให้ทราบว่า เชื้อ *B. coagulans* NF17 ไม่มีการเจริญเพิ่มจำนวนเมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง แต่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 45°C หลังบ่มครบ 24 ชั่วโมงในชุดที่เติม $CaCO_3$ เชื้อเพิ่มจาก 6.78 log CFU/ml ขึ้นเป็น 8.75 log CFU/ml ในขณะที่ชุดที่ไม่เติมเติม $CaCO_3$ เชื้อเพิ่มจาก 6.95 log CFU/ml ขึ้นเป็น 8.77 log CFU/ml นั่นแสดงว่าเชื้อ *B. coagulans* NF17 เจริญได้ดีเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 45°C และมีการเจริญไม่แตกต่างกันในชุดการทดลองที่มีการเติมหรือไม่เติม $CaCO_3$

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* SK5 ในน้ำต้มเส้นขนมจีนที่ผสมนม UHT 10% และบ่มที่อุณหภูมิห้อง หลังบ่มครบ 24 ชั่วโมงพบว่า ชุดที่เติม $CaCO_3$ เชื้อเพิ่มจาก 6.87 log CFU/ml ขึ้นเป็น 8.21 log CFU/ml

ในขณะที่ชุดที่ไม่เติม $CaCO_3$ เชื้อเพิ่มจาก 6.84 log CFU/ml ขึ้นเป็น 7.56 log CFU/ml จากข้อมูลนี้บอกให้ทราบได้ว่าเชื้อ *Lactobacillus* SK5 มีการเจริญเพิ่มจำนวนได้ดีแม้บ่มที่อุณหภูมิห้อง (ไม่ได้ควบคุมอุณหภูมิการบ่มให้อยู่ที่ 30°ซ.) โดยชุดที่เติม $CaCO_3$ พบมีจำนวนเชื้อมากกว่ากลุ่มที่ไม่เติม $CaCO_3$ ประมาณ 0.6 log

ในชุดการทดลองที่เติม $CaCO_3$ และบ่มที่อุณหภูมิ 30°C หลังบ่มครบ 24 ชั่วโมง พบเชื้อ *Lactobacillus* SK5 เพิ่มจาก 6.89 log CFU/ml ขึ้นเป็น 9.45 log CFU/ml ในขณะที่ชุดที่ไม่เติม $CaCO_3$ และบ่มที่อุณหภูมิ 30°C พบว่าเชื้อเพิ่มจาก 6.80 log CFU/ml ขึ้นเป็น 9.62 log CFU/ml ที่การบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เชื้อเจริญได้ดีกว่าบ่มที่อุณหภูมิห้องอาจเนื่องมาจากในชุดการทดลองนี้ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* SK5 ในน้ำต้มเส้นขนมจีนที่ผ่านการย่อยสลายแป้งด้วยเชื้อชอบร้อน *B. coagulans* NF17 ที่อุณหภูมิถูกควบคุมไว้ที่ 45°C ซึ่งเป็น optimum growth temperature ของเชื้อสายพันธุ์ NF17 ทำให้เชื้อ NF17 เจริญได้ดีจึงส่งผลให้มีการย่อยแป้งเปลี่ยนเป็นน้ำตาลซึ่งเป็นอาหารของเชื้อ *Lactobacillus* SK5 ได้มากด้วย ดังนั้นจึงพบว่า *Lactobacillus* SK5 อยู่ในจำนวนที่สูง โดยชุดที่เติม $CaCO_3$ มีจำนวนเชื้อมากกว่ากลุ่มที่ไม่เติม $CaCO_3$ เพียงเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญ



รูปที่ 5 การเจริญของเชื้อ *B. coagulans* NF17 และ *Lactobacillus* SK5 เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ควบคุม/ไม่ควบคุม pH และควบคุม/ไม่ควบคุมอุณหภูมิ

D0: จำนวนแบคทีเรียที่นับทันทีหลังจาก inoculate เชื้อ;

D1: จำนวนแบคทีเรียที่นับหลังจากผ่านการเพาะเลี้ยงครบ 1 วัน (24 ชั่วโมง)

3.5 ศึกษาเปรียบเทียบแบคทีเรียในรูปเชื้อผงแห้ง (lyophilized form) และในรูปเชื้อสดบนอาหารวุ้นเอียง (agar slant) เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ (inoculum) ในการหมักน้ำต้มเส้นขนมจีน

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. coagulans* NF17 ในน้ำต้มเส้นขนมจีนโดยใช้หัวเชื้อสด *B. coagulans* NF17 จาก NA slant พบว่ามีเชื้อเพิ่มจาก 3.08 log CFU/ml ขึ้นเป็น 4.27 log CFU/ml ในขณะที่เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. coagulans* NF17 โดยใช้เชื้อผงแห้ง พบว่ามีเชื้อเพิ่มจาก 2.72 log CFU/ml ขึ้นเป็น 3.34 log CFU/ml (ดูตารางที่ 8 และรูปที่ 6)

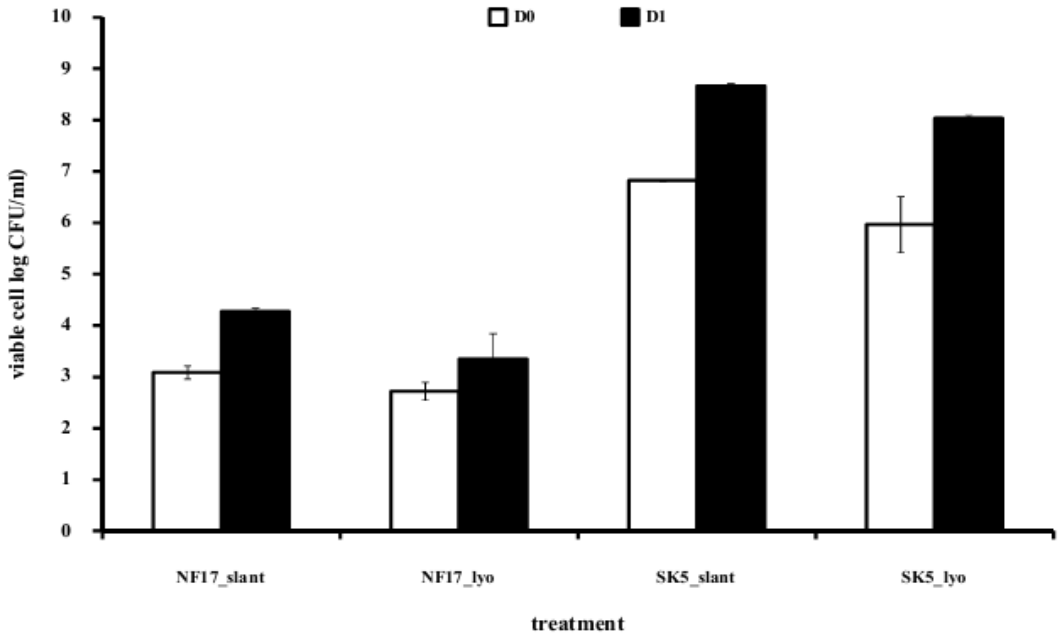
เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* SK5 น้ำต้มเส้นขนมจีนที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อ *B. coagulans* NF17 โดยใช้หัวเชื้อสดจาก *Lactobacillus* SK5 จาก MRS slant พบว่าเชื้อเพิ่มจาก 6.82 log CFU/ml เป็น 8.66 log CFU/ml ในขณะที่เมื่อใช้เชื้อผงแห้ง พบว่า *Lactobacillus* SK5 เพิ่มจาก 5.96 log CFU/ml ขึ้นเป็น 8.03 log CFU/ml (ดูตารางที่ 8 และรูปที่ 6)

ตารางที่ 8 การเจริญของเชื้อ *B. coagulans* NF17 และ *Lactobacillus* SK5 เมื่อใช้เชื้อสดบนอาหารวุ้นเอียง (slant) และเชื้อผงแห้ง (lyophilized cells) เป็นหัวเชื้อ

ชุดการทดลอง	pH		จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml)	
	Day 0	Day 1	Day 0	Day 1
เชื้อสด *B. coagulans* NF17	3.73	3.81	$1.2x10^3$	$1.9x10^4$
เชื้อผงแห้ง *B. coagulans* NF17	3.8	3.84	$5.5x10^2$	$3x10^3$
เชื้อสด *Lactobacillus* SK5	3.83	3.36	$6.7x10^6$	$4.65x10^8$
เชื้อผงแห้ง *Lactobacillus* SK5	3.82	3.61	$1.3x10^5$	$1.1x10^8$

หมายเหตุ: Day 0 แสดงค่าที่ตรวจวัดน้ำหมักทันทีหลังจากเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย

Day 1 แสดงค่าที่ตรวจวัดน้ำหมักหลังจากเติมหัวเชื้อแบคทีเรียแล้วทำการเพาะเลี้ยงครบ 1 วัน (24 ชั่วโมง)



รูปที่ 6 การเจริญของเชื้อ *B. coagulans* NF17 และ *Lactobacillus* SK5 แสดงด้วยค่า viable cells (CFU/ml) เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำต้มเส้นขนมจีนโดยใช้เชื้อสด (slant) และเชื้อผงแห้งในรูป lyophilize (lyo) เป็นเวลา 1 วัน

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้หัวเชื้อสดในรูปของ slant หรือเชื้อผงแห้งในรูป lyophilize นั้น เชื้อมีจำนวนไม่แตกต่างกัน จึงสามารถใช้หัวเชื้อในทั้งสองแบบสำหรับเพาะเลี้ยงในน้ำต้มเส้นขนมจีนได้ โดยเชื้อสดในรูป slant มีความ active กว่าแต่ต้องเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นและเก็บไว้ได้ไม่กี่สัปดาห์ ในขณะที่เชื้อผงแห้งในรูป lyophilize มีขั้นตอนในการเตรียมให้ได้เชื้อผงแห้งที่ยุ่งยากกว่า แต่สามารถเก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานเป็นปี

3.7 จัดอบรมและทำคู่มือแนะนำการเพาะเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกให้กับเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการ

3.7.1 จัดทำเอกสารประกอบการฝึกอบรม แบบประเมินการอบรม และแผ่นพับ ดังแสดงในภาคผนวก

3.7.2 ดำเนินการฝึกอบรม

ในการอบรมครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณไพร สุดจิตร์ พนักงานสงเคราะห์สวนยาง ระดับ 5 ของสำนักงานกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง จังหวัดขอนแก่น ช่วยประสานงานกับนายสินธนู นนทศิริ ผู้ใหญ่บ้าน บ้านตอประดู่ ให้ทีมนักวิจัยได้เข้าไปอบรมให้เกษตรกร ณ. หมู่บ้านเฉลิมพระเกียรติชาวสวนยาง ๕๐ พรรษามหาวชิราลงกรณ์ ซึ่งตั้งอยู่ที่หมู่ ๑๑ ตำบลดูนสาด อำเภอกระนวน จังหวัดขอนแก่น โดยจัดการอบรมในวันที่ ๑๐ กรกฎาคม พ.ศ. ๒๕๕๕ มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

- เกษตรกรเข้าอบรม ๒๘ คน เป็นเพศชาย 9 คน คิดเป็นร้อยละ 32.14 เพศหญิง 18 คน คิดเป็นร้อยละ 64.29 ไม่ระบุเพศ 1 คน คิดเป็นร้อยละ 3.57
- มีอายุระหว่าง 27-59 ปี เฉลี่ย 46.28 ปี
- ระดับการศึกษา ป.4 จำนวน 7 คน คิดเป็นร้อยละ 25 ป.6จำนวน 9 คน คิดเป็นร้อยละ 32.14ม.6 จำนวน 6 คน คิดเป็นร้อยละ 21.43ไม่ระบุการศึกษาจำนวน 6 คนคิดเป็นร้อยละ 21.43%
- ประกอบอาชีพอาชีพทำนาจำนวน 9 คน คิดเป็นร้อยละ 32.14 เลี้ยงสุกรจำนวน 4 คนคิดเป็นร้อยละ14.29 เลี้ยงหมูและทำนา จำนวน 7 คน คิดเป็นร้อยละ 25 รับจ้างทั่วไป 2 คน คิดเป็นร้อยละ 7.14 ไม่ระบุอาชีพ 6 คน คิดเป็นร้อยละ 21.43

3.7.3 ประเมินผลการฝึกอบรม

ผลการประเมินสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการประเมินการจัดอบรมเกษตรกรในหัวข้อ “การเพาะเลี้ยงและการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกเพื่อเป็นอาหารเสริมสำหรับสุกร”

การอบรม	ระดับความพึงพอใจ	
	คะแนนเฉลี่ย	ร้อยละ
๑. สถานที่จัดอบรม	3.86	77
๒. อาหารว่างและเครื่องดื่ม	3.82	76
๓. ความรู้จากเอกสารประกอบการฝึกอบรม	4.50	90
๔. ความรู้ที่ได้จากวิทยากร	4.50	90
๕. ความเหมาะสมของระยะเวลาที่ใช้อบรม	3.71	74
๖. การสาธิตวิธีการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติก	4.18	84
๗. โอกาสในการซักถามข้อปัญหา	3.82	76
๘. ความสามารถในการตอบคำถามของวิทยากร	4.32	86
๙. ท่านได้รับความรู้/ประโยชน์	4.54	91
๑๐. สรุปภาพรวมของการจัดอบรมครั้งนี้	4.46	89

มีระดับความพึงพอใจอยู่ในเกณฑ์มาก คิดเป็นร้อยละ 74-77 ในเรื่อง สถานที่จัดอบรม อาหารว่างและเครื่องดื่ม ความเหมาะสมของระยะเวลาที่ใช้อบรม และโอกาสในการซักถามข้อปัญหา มีระดับความพึงพอใจอยู่ในเกณฑ์มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 84-91 ในเรื่อง ความรู้จากเอกสารประกอบการฝึกอบรม ความรู้ที่ได้จากวิทยากร การสาธิตการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติก ความสามารถในการตอบคำถามของวิทยากร ความรู้และประโยชน์ที่ได้รับ และภาพรวมในการจัดอบรมครั้งนี้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อแนะนำ

การศึกษาจำแนกระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกไอโซเลท SK5 พบว่าจากการใช้ conventional identification method ตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology volume 2 พบว่าคุณสมบัติของเชื้อ 17 คุณสมบัติ ให้ผลใกล้เคียงกับเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* แต่เมื่อทดสอบด้วย API test kits รวม 49 คุณสมบัติ ระบุว่าใกล้เคียงกับเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ดังนั้นจึงควรได้มีการทดสอบยืนยันชนิดเชื้อด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยใช้ลำดับเบสบนยีนส์ 16S rDNA

ในการศึกษาความสามารถ *Lactobacillus* สายพันธุ์ SK5 ซึ่งคัดเลือกได้เป็นเชื้อโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อก่อโรคท้องร่วงในสุกรโดยเพาะเลี้ยงในน้ำต้มเส้นขนมจีนร่วมกับเชื้อ *Bacillus coagulans* NF 17 ที่สร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ดีนั้น พบว่าน้ำต้มเส้นขนมจีนที่เสริมด้วยน้ำนมยูเอชที 10% สามารถใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้สภาวะที่เกษตรกรสามารถทำได้จริง ได้แก่ เมื่อเติมเชื้อทนร้อน (thermotolerant) *Bacillus coagulans* NF 17 เป็นเชื้อแรกในน้ำต้มเส้นขนมจีนและนำไปตากแดดตลอดวัน (ประมาณ 8 ชั่วโมง) หลังจากนั้นบ่มต่อไปที่อุณหภูมิห้องอีก 16 ชั่วโมง (บ่มครบ 1 วัน) เพื่อให้เชื้อย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล พบว่าความร้อนจากแสงแดดช่วยฆ่าเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ปนเปื้อนมาในน้ำต้มเส้นขนมจีนได้ดี และเมื่อเติมเชื้อโปรไบโอติก *Lactobacillus* SK5 ในวันที่ 2 บ่มต่อที่อุณหภูมิห้องอีก 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *Lactobacillus* SK5 สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้เป็น $1.1x10^8$ - $4.7x10^8$ CFU/มิลลิลิตรของน้ำต้มเส้นขนมจีน ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงมากพอที่จะนำไปใช้เสริมอาหารให้สุกรได้ โดยผสมน้ำต้มเส้นขนมจีนที่ผ่านการหมักนี้กับอาหารสุกรในอัตราส่วน 10-100 มิลลิลิตรต่ออาหารสุกร 1 กิโลกรัม ซึ่งจะทำให้มีเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกผสมอยู่ในอาหารตามความเข้มข้นที่แนะนำคือไม่ต่ำกว่า 10^6 CFU/กรัมของอาหาร (Guo et. al., 2006; Kyriakis, et. al., 1999; Zani et. al., 1998)

จากการที่ทีมนักวิจัยออกไปจัดการอบรมให้แก่เกษตรกร พบว่าเกษตรกรที่อาสาสมัครทำปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเชื้อ สามารถเขี่ยเชื้อสดจากหลอดอาหารวุ้นเอียงและเชื้อผงแห้งจากหลอดแอมปูลได้โดยไม่ยาก และเกษตรกรมีความสนใจที่จะเรียนรู้วิทยาการใหม่ๆ กระตือรือล้นที่จะนำเอาความรู้ที่ได้ไปทดลองทำใช้เอง ซึ่งถ้าทีมวิจัยสามารถไปแวะเยี่ยม ติดตามผลได้ต่อเนื่อง น่าจะส่งผลให้เกษตรกรมีการนำเอาแบคทีเรียโปรไบโอติกไปใช้ในอาหารสัตว์แทนที่ยาปฏิชีวนะอย่างยั่งยืน

นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก *Lactobacillus* SK5 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบที่สมบูรณ์กว่าน้ำต้มเส้นขนมจีน และมีการควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยง เช่น ค่า pH รอบกวน และอุณหภูมิที่ใช้บ่ม จะสามารถผลิตเชื้อนี้ได้ในความเข้มข้นที่สูงขึ้น จึงมีศักยภาพในการต่อยอดพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกทางการค้าอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

ดาราวรรณ ร่วมกุศล และเสาวนิต ทองพิมพ์. 2548. การแยกหาและศึกษาเชื้อแบคทีเรียซึ่งสร้างกรดแลคติกที่สามารถทนและ/หรือชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง. รายงานโครงงานวิจัยปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 47 หน้า.

ธวัชชัย โพธิ์เฮือง, เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล และ กัลยา เจือจันทร์. 2547. ประสิทธิภาพของการใช้โปรไบโอติกในการเลี้ยงไก่. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 14(2):52-61.

นวลจันทร์ พารักษา และ นันทวัน บุญยะประภัศร. 2545. ศักยภาพในการใช้สมุนไพรในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ (คู่มือการวิจัยสมุนไพรในสัตว์). แสงเทียนการพิมพ์:กรุงเทพฯ.

Adami, A., A. Sandrucci and V. Cavazzoni. 1997. Piglets fed from birth with the probiotic *Bacillus coagulans* as additive: zootechnical and microbiological aspects. Ann. Microbiol. Enzymol. 47: 139-149.

Alder, H.E. and A.J. Damassa. 1980. Effects of ingested lactobacilli on *Salmonella* and *Escherichia coli and* on intestinal flora, Pasted vend and chick growth. Avian Diseases. 24: 868-878.

Betoret, N., L. Puente, M.J. Diaz., M.J. Pagan, M. J. Garcia, M. L. Gras, J. Martinez and P. Fito. 2003. Development of probiotic-enriched dried fruits by vacuum impregnation.J. Food Eng. 56:273-277.

Casey G.P., G.E. Gardiner, G. Casey, B. Bradshaw, P.G. Lawlor, P.B. Lynch, F.C. Leonard, C. Stanton, R.P. Ross, G.P. Fitzgerald, and C. Hill. 2006. A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Appl. Environ. Microbiol. 1858-1863.

De Angelis, S. Siragusa, M.Berloco, L. Caputo, L. Settanni, G. Alfonsi, M. Amerio, A.Grandi, A.Ragni and M. Gobbetti. 2006. Selection of potential probiotic lactobacilli form pig feces to be used as additives in pelleted feeding. Res. Microbiol. 157: 792-801.

De Angelis, M.S. Siragusa, L. Caputo, A. Ragni, R. Burzigotti, M. Gobbetti. 2007. Survival and persistence of *Lactobacillus plantarum* 4.1 and *Lactobacillus reuteri* 3S7 in the gastrointestinal tract of pigs. Vet. Microbiol. 123:133-144.

Du Toit,M., Franz, C.M.A.P., Dick, L.M.T., Schilinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F.,Holzapfel, W.H., 1998. Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol level, faeces pH and faeces moisture content. Int. J. Food Microbiol. 40: 93-104.

Fuller, R. 1989. Probiotic in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66:365-378.

Gatesoupe, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture. 180: 147-156.

Guerra, N.P., P. F. Bernardez, J. Mendez, P. Cachaldora, L. P. Castro. 2006. Production of potentially probiotic lactic acidbacteria and their evaluation as food additives for weaned piglets. Animal feed Sci. Technol. 134: 89-107.

Guo, X., D. Li, W. Lu, X. Piao and X. Chen. 2006. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. Antonie van Leeuwenhoek. 90:139-146.

Jack, R.W., J.R. Tagg and B. Ray. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. 59: 171-200.

Kalantzopoulos, G. 1997. Fermented products with probiotic qualities. Anaerobe. 3: 185-190.

Kaur, I. P., K. Chopra and A. Saini. 2002. Probiotics : potential pharmaceutical applications. Eur J. Pharm. Sci: 15-1-9.

Kyriakis, S.C., V.K. Tsiloyaiannis, J. Vlemmas, K. Sarris, A.C. Tsinas, C. Alexopoulos and L. Jansegers. 1999. The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhea syndrome of piglets. Res. Vet. Sci. 67: 223-228.

Mombelli, B. and M.R. Gismondo. 2000. The use of probiotics in medical practice. Int. J. Antimicrob. Agents. 16:531-536.

Niloskelainen, S., S. Salminen, G. Bylund and A.C. Ouwehand. 2001. Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. 67: 2430-2435.

Ohashi, Y., Y. Umesaki and K. Ushida. 2004. Transition of the probiotic bacteria, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract of a pig. Int. J. Food Microbiol. 96: 61-66.

Pollman, D.S., D.M. Danielson, and E. R. Peo, Jr. 1980. Effect of microbial feed additive on performance of starter and growing-finishing pigs. J. Anim. Sci. 51:577-581.

Prasad, J., G. Harsharanjit, and P.K. Gopal. 1999. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. Int. J. Food Microbiol. 8:993-1002.

Reuter, G., G. Klein and M. Goldberg. 2002. Identification of probiotic cultures in food samples. Food Research International. 335: 117-124.

Robertson, P.A. W., C. O'Dowd, C. Burrells, P Williams and B. Austin. 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmon sala*r L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Aquaculture. 185: 235-243.

Schrezenmeir, J. and M. de Vrese. 2001 Probiotics, and symbiotics-approaching: a definition. Am. J Clin. Nutr.73 (2 Suppl.): 3615-364S.

Tsai, C-C., H.-Y. Hsih, H-H. Chiu, Y-Y. Lai, J.-H. Liu. B. Yu and H-Y. Tsen. 2005 Antagonistic activity against *Salmonella* infection in vitro and in vivo for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. Int. J. Food Microbiol. 102:185-194.

William, S.T., E.M. Sharp and J.G. Holt. 1989. Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Williams & Wilkins, London.

Yen J., A. Nienaber and W.G. Pond. 1987. Effect of neomycin, carbadox and length of adaptation to calorimeter on performance, fasting metabolism and gastrointestinal tract of young pigs. J. Anim. Sci. 65: 1243-1248.

Zani, J.L., F.W. de Cruz, A.F. dos Santos and C. Gil-Turnes. 1998. Effect of probiotic CentBiot on the control of diarrhea and feed efficiency in pigs. J. Appl. Microbiol. 84: 68-71.

ภาคผนวก ก.

เอกสารที่จัดทำเพื่อใช้ประกอบการอบรมเกษตรกร

แบบประเมินการอบรม

โครงการอบรมเกษตรกร “การเพาะเลี้ยงและการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกเพื่อเป็นอาหารเสริมในสุกร”

วันที่ ๑๐ กรกฎาคม พ.ศ. ๒๕๕๕

ณ. หมู่บ้านเฉลิมพระเกียรติชาวสวนยาง ๕๐ พรรษา มหาวชิราลงกรณ์ อ. กระนวน จ. ขอนแก่น

.....

ตอนที่ ๑ ข้อมูลทั่วไป

คำชี้แจง ให้ทำเครื่องหมาย √ ลงในช่องที่ตรงกับสถานภาพของท่าน

๑.เพศ O ชาย O หญิง O อายุ ..... ปี

๒.ระดับการศึกษา O ป. ๖ O ม. ๖ O อื่นๆ (ระบุ) .....

๓.อาชีพ O ทำนา O เลี้ยงสุกร O ผลิตเส้นขนมจีน

O อื่นๆ (ระบุ) .....

ตอนที่ ๒ การบรรลุวัตถุประสงค์

คำชี้แจง ให้ทำเครื่องหมาย √ ลงในช่องที่ตรงกับสถานภาพของท่าน

การอบรม	**ระดับความพึงพอใจ**				
	มากที่สุด (5)	**มาก (4)**	**ปานกลาง (3)**	**น้อย (2)**	**น้อยที่สุด (1)**
๑. สถานที่จัดอบรม					
๒. อาหารว่างและเครื่องดื่ม					
๓. ความรู้จากเอกสารประกอบการฝึกอบรม					
๔. ความรู้ที่ได้จากวิทยากร					
๕. ความเหมาะสมของระยะที่ใช้อบรม					
๖. การสาธิตวิธีการเพาะเลี้ยงโปรไบโอติก					
๗. โอกาสในการซักถามข้อปัญหา					
๘. ความสามาถในการตอบคำถามของวิทยากร					
๙. ท่านได้รับความรู้/ประโยชน์					
๑๐. สรุปภาพรวมของการจัดอบรมครั้งนี้					

ตอนที่๓ ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม

.....

.....

.....

ภาคผนวก ข

รูปภาพกิจกรรมระหว่างการฝึกอบรมเกษตรกร

รเพาะเลี้ยงและการใช้
ยโปรไบโอติกเพื่อเป็น
รเสริมสำหรับสุกร

Thomas
Cook.com

อบรมการเพาะเลี้ยงและการใช้
แบคทีเรียโปรไบโอติกเพื่อเป็น
อาหารเสริมสำหรับสุกร