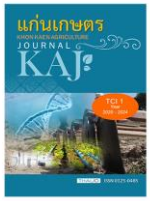
วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj



คุณสมบัติและความคงทนของสปอร์บาซิลลัสโพรไบโอติกในอาหารไก่

Properties and stability of probiotic *Bacillus* spores in chicken feed

วราภรณ์ สีหาโมก[1,2], จิตติมา มะประสิทธิ์[1], สมพงษ์ สุขขาวงษ์[3], รพีวรรณ โสวรรณปรีชา[2], อรทัย แดงสวัสดิ์[3] และ ปฏิมา เพิ่มพูนพัฒนา[2]*

Waraphorn Sihamok[1,2], Jidtima Maprasit[1], Sompong Sukhawong[3], Rapeewan Sowanpreecha[2], Orathai Dangsawat[3] and Patima Permpoonpattana[2]*

[1] *สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี*
[1] *Program in Agricultural Science and Technology, Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Surat Thani Campus*
[2] *สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร โครงการจัดตั้งคณะนวัตกรรมการเกษตรและประมงมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี*
[2] *Program in Agricultural Science and Technology, Faculty of Innovative Agriculture and Fishery Establishment Project, Prince of Songkla University, Surat Thani Campus*
[3] *ศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์และเครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี*
[3] *Scientific Laboratory and Equipment Center, Prince of Songkla University, Surat Thani Campus*

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติและความคงทนของสปอร์บาซิลลัสโพรไบโอติกในสภาวะต่าง ๆ ของแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต ได้แก่ *Bacillus aryabhattai* (CKNJh11), THPS1, PWR01 และ OYNH19 ซึ่งคัดแยกได้จากดินบริเวณบ่อกุ้ง ดินบ่อน้ำพุร้อน เซรั่มก้อนถ้วยยางพารา และ มูลไก่ โดยทั้ง 4 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพในการสร้างสปอร์ คือ 97.05, 92.21, 92.08 และ 84.58% ตามลำดับ ในการทดสอบการทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 83% การทนต่อเกลือน้ำดี มีอัตราการรอดสูงกว่า 73% และสปอร์ของไอโซเลต OYNH19 สามารถทนความร้อนได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 80 °C โดยมีอัตราการรอดชีวิต คือ 91.30% ส่วน *B. aryabhattai* (CKNJh11), THPS1 และ PWR01 สามารถทนความร้อนได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 70 °C โดยมีอัตราการรอดชีวิต คือ 85.94, 90.10 และ 90.79% ตามลำดับ ความสามารถการทนต่อแอลกอฮอล์ ไลโซไซม์ และความเค็ม พบว่าสปอร์ของทั้ง 4 ไอโซเลต มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่า 70% เมื่อนำสปอร์ทั้ง 4 ไอโซเลต มาผสมในอาหารไก่และเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่าสปอร์แบคทีเรียของทั้ง 4 ไอโซเลต มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 70% จากผลการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าสปอร์ของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสที่ผ่านการทดสอบทั้ง 4 ไอโซเลต มีความเสถียร คงทน และทนทานต่อสภาวะต่าง ๆ ได้ดี สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นโพรไบโอติกทางการเกษตรด้านการเลี้ยงสัตว์และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้

คำสำคัญ: ความคงทน; สปอร์; บาซิลลัส; โพรไบโอติก; อาหารไก่

ABSTRACT: The objective of this research was to study the properties and persistence of probiotic *Bacillus* spore under different conditions of 4 bacteria isolates of namely *B. aryabhattai* (CKNJh11), THPS1, PWR01, and OYNH19 which were separated from shrimp pond soil, hot spring soil, cup lump rubber and chicken feces. The 4 isolates had 97.05, 92.21, 92.08, and 84.58% of sporulation efficiency, respectively. In the gastric acid tolerance test the survival rate was greater than 83%. Bile salt tolerance had a higher survival rate than 73% and the isolate OYNH19 spores were the best heat resistant at 80 °C, with a survival rate of 91.30%. *B. aryabhattai* (CKNJh11), THPS1 and PWR01 had the best heat resistance at 70 °C, with survival rates of 85.94, 90.10 and 90.79%, respectively. The ability of tolerances to alcohol lysozyme and salinity of 4 isolates had higher survival rates of more than 70%. When the four

* Corresponding author: patima.pe@psu.ac.th

Received: date; October 26, 2022 Accepted: date; March 7, 2023 Published: date;

isolates of the bacterial spores were mixed in chicken feed and kept at various temperatures for 30 days, the bacterial spores of the 4 isolates showed a survival rate of more than 70%. The results of this study showed that the *Bacillus* spores tested in all 4 isolates were stable, durable, and resistant to various conditions. It can be applied to use as probiotics in agriculture, animal husbandry, and the feed industry.
Keywords: stability; spore; *Bacillus*; probiotic; chicken feed

บทนำ

ในปัจจุบันมีการนำจุลินทรีย์มาประยุกต์ใช้ประโยชน์มากมาย ทั้งด้านอุตสาหกรรม ด้านการเกษตร ด้านสิ่งแวดล้อม รวมถึงด้านสุขภาพ จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่พบได้ในสิ่งแวดล้อม คน และสัตว์ มีทั้งชนิดที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษ โพรไบโอติกจัดเป็นเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เมื่อมีอยู่ในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยให้ระบบในร่างกายทำงานเป็นปกติ (Anee et al., 2021) โดยเฉพาะระบบทางเดินอาหารและระบบภูมิคุ้มกันกลุ่มโพรไบโอติก ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacilli*, Bifidobacterium, *Streptococci* และ *Bacillus* (Alkalbani et al., 2019) สปอร์ของแบคทีเรียเป็นสิ่งถูกสร้างขึ้นเมื่อแบคทีเรียอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และเป็นโครงสร้างที่ทำให้แบคทีเรียมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ รวมทั้งสามารถทนต่ออุณหภูมิต่าง ๆ ในกระบวนการผลิตในปัจจุบันสปอร์โพรไบโอติกถูกใช้อย่างกว้างขวางในมนุษย์เพื่อเป็นอาหารเสริมในสัตว์ใช้เป็นสารเสริมเร่งการเจริญเติบโต (Ramlucken et al., 2020) ดังนั้นแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัสนั้นจึงเป็นหนึ่งในทางเลือกของโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพ เป็นที่ยอมรับในปัจจุบัน และมีความปลอดภัยในการนำมาใช้ในด้านต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นด้านการแพทย์ ด้านการเกษตรและการเลี้ยงสัตว์ เป็นต้น (Cutting, 2011)

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. สามารถคัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ได้แก่ ดิน (Mohkam et al., 2019) น้ำพุร้อน (Mohammad et. al., 2017) ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ (Nguyen et. al., 2015) และมูลสัตว์ (Li et al., 2019) เป็นต้น โดยแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. จากแหล่งที่ต่างกันจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันออกไปตามสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่ แบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. ที่นิยมนำมาใช้เป็นสารเสริมโพรไบโอติกทั้งในมนุษย์และสัตว์มากที่สุด ได้แก่ *B. subtilis, B. clausii, B. aryabhattai, B. coagulans* และ *B. licheniformis* (Elshaghabee et al., 2017) เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มของแบคทีเรียแลคติกที่ไม่สร้างสปอร์ (Konuray and Erginkaya, 2018) อีกทั้งง่ายต่อการเก็บรักษาและการนำไปใช้ในรูปของโพรไบโอติก

ปัจจุบันมีการนำจุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Bacillus* spp. มาประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ไม่ว่าจะเป็นสัตว์บกหรือสัตว์น้ำ หรือใช้เสริมในอาหารสัตว์เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต และเพิ่มผลผลิตที่ได้จากสัตว์ (อรทัย และคณะ, 2563) โดยมุ่งหวังประโยชน์ลดการใช้สารปฏิชีวนะช่วยเร่งการเจริญเติบโตและป้องกันโรคในสัตว์ เนื่องจากในอดีตได้มีการใช้สารปฏิชีวนะอย่างแพร่หลายในการเลี้ยงสัตว์ ผลเสียที่ติดตามมาของการใช้สารปฏิชีวนะคือ การตกค้างของสารปฏิชีวนะที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพและชีวิตของผู้บริโภค ในขณะที่จุลินทรีย์โพรไบโอติกไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์จะนำโพรไบโอติกมาใช้ในรูปสารละลายหรือเสริมกับอาหารสัตว์ โดยพบว่าสามารถลดความเครียดของสัตว์ เพิ่มความต้านทานโรคทำให้สัตว์เจริญเติบโตได้อย่างแข็งแรงกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และเพิ่มผลผลิตของสัตว์ (คึกฤทธิ์, 2561; Barbosa et al., 2005)

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติและความคงทนของสปอร์แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. ในสภาวะต่าง ๆ ได้แก่ กรดเกลือน้ำดี ความร้อน ไลโซไซม์ และศึกษาประสิทธิภาพการผสมสปอร์ของ *Bacillus* spp. ลงในอาหารไก่โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ เพื่อนำมาเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้เป็นโพรไบโอติกทางการเกษตรด้านการเลี้ยงสัตว์

วิธีการศึกษา

แหล่งที่มา สัญฐานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมี และประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียจากแหล่งตัวอย่าง จากดินบ่อน้ำพุร้อน คือ ไอโซเลต THPS1 (พัณณิตา และ สริตา, 2561) จากดินบริเวณบ่อกุ้ง คือ *B. aryabhattai* (CKNJh11) (อรทัย, 2563) จากมูลไก่ คือไอโซเลต OYN19 (อรทัย, 2563) จากเซรั่มก้อนถ้วยยางพารา คือ ไอโซเลต PWR01 (วราภรณ์ และคณะ, 2564) ทั้งหมด 4 ไอโซเลต มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) ด้วยวิธีการเกลี่ย

เชื้อ (Spread plate) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชม. ตรวจนับจำนวนโคโลนี จากนั้นนำแบคทีเรียแกรมบวกที่ได้จากการทดสอบย้อมแกรม (Gram strain) มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ Motility test, Starch hydrolysis test, Oxidase test, Catalase test และ Indole test จากนั้นนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB) broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 18 ชม. จากนั้นถ่ายเชื้อลงบน Difco Sporulation Medium (DSM) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 72 ชม. ขูดสปอร์ออกจากผิวหน้าอาหารและล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ จากนั้นแบ่งเป็นสองกลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มที่ไม่ให้ความร้อน และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C จากนั้นเจือจางและนำมาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชม. วางแผนทุกการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มีการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ (Permpoonpattana et al., 2012)

การทดสอบความทนต่อกรดและเกลือน้ำดีของสปอร์แบคทีเรีย

นำสปอร์ของแบคทีเรียมาทดสอบการทนต่อกรดโดยถ่ายสปอร์ลงในเปปซิน pH 2.0, 3.0 และ 4.0 เกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5% บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชม. จากนั้นตรวจสอบการมีชีวิตโดยเจือจางด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85% และนำมาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. วางแผนทุกการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มีการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณอัตราการรอดชีวิต (Kavitha et al., 2018)

การทดสอบการทนความร้อนของสปอร์แบคทีเรีย

นำสปอร์ของแบคทีเรียมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50, 70, 80 และ 95 °C เป็นเวลา 30 นาที ตรวจการมีชีวิตของเชื้อโดยเจือจางด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85% และนำมาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชม. วางแผนทุกการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มีการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณอัตราการรอดชีวิต (Luong et al., 2018)

การทดสอบความทนต่อไลโซไซม์ของสปอร์แบคทีเรีย

นำสปอร์ของแบคทีเรียมาทดสอบการทนต่อไลโซไซม์โดยถ่ายเชื้อลงในไลโซไซม์ในอัตราส่วน 1:1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30, 60 และ 120 นาที ตรวจการมีชีวิตของเชื้อโดยเจือจางด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85% และนำมาเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชม. วางแผนทุกการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มีการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณอัตราการรอดชีวิต (Ragul et al., 2017)

การผสมสปอร์ขอแบคทีเรียในอาหารไก่ และการตรวจสอบความมีชีวิตของสปอร์

นำสปอร์ของแบคทีเรียมาผสมในอาหารไก่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและทำให้แห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นำอาหารมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 °C เป็นเวลา 14 และ 30 วัน ทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำอาหารไก่ปริมาณ 1 ก. มาเจือจาง ด้วยโซเดียม คลอไรด์ 0.85% เกลี่ยลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชม. วางแผนทุกการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) มีการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และคำนวณอัตราการรอดชีวิต (Nguyen et al., 2015; อรทัย และคณะ 2563)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธีวิเคราะห์การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลการศึกษา

การศึกษาลักษณะสัญฐานวิทยา ทดสอบทางชีวเคมี และการสร้างสปอร์

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อยืนยันแบคทีเรีย พบว่า ย้อมติดสีแกรมบวก และมีรูปร่าง เป็นแท่งสั้นหรือแท่งยาว **(Table 1)** ส่วนการทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ แคทาเลส ออกซิเดส อินโดล การเคลื่อนที่ ไฮโดรลิซิสของแป้ง และการสร้างสปอร์ พบว่า

แบคทีเรียทุกไอโซเลต สามารถเคลื่อนที่ได้ ทดสอบการย่อยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์แคทาเลส และสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสมาใช้ในการย่อยแป้งซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นบวก ทดสอบออกซิเดส พบว่าไม่มีการผลิตเอนไซม์ไซโทโครมออกซิเดส และการทดสอบอินโดล พบว่าไม่สามารถผลิตอินโดลจากทริพโตเฟนได้ ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นลบ และจากการทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ PWR01, THPS1, OYNH19 และ *B. aryabhattai* (CKNJh11) พบว่า ทั้ง 4 ไอโซเลต สามารถสร้างสปอร์ได้ และมีประสิทธิภาพในการสร้างสปอร์ คือ 97.05, 92.21, 92.08 และ 84.58% ตามลำดับ โดย PWR01 มีประสิทธิภาพการสร้างสปอร์สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่น (P<0.05) **(Figure 1)**

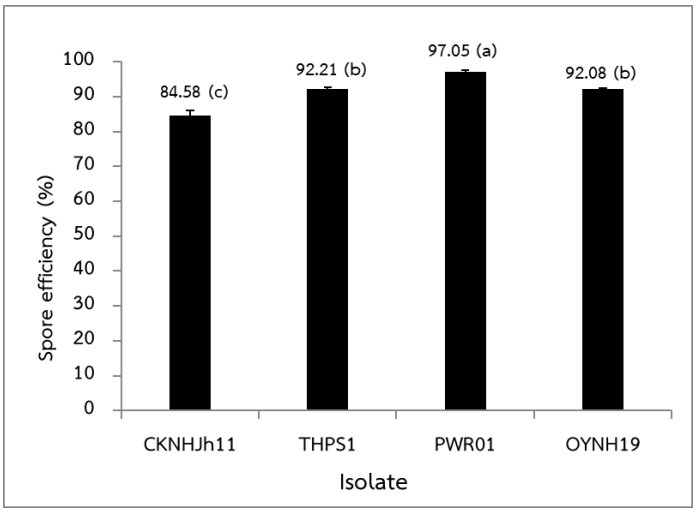


Figure 1 The percentage of spore efficiency of isolated bacteria

* Different lowercase superscripts ($^{a–c}$) on the bar indicate significant differences (P<0.05)

(n = 3, Error bars represent standard deviation among three replicates)

Table 1 Morphology and biochemical test of four isolated bacteria

			Biochemical test				
					Starch		
Bacteria	Gram stain	Shape	Catalase	Oxidase	hydrolysis	Motility	Indole
CKNJh11	+	bacilli	+	-	+	+	-
THPS1	+	bacilli	+	-	+	+	-
PWR01	+	bacilli	+	-	+	+	-
OYNH19	+	rod	+	-	+	+	-

The increased mark (+) in column rod shapes is gram positive bacteria and positive of biochemical test

(–) in column rod shapes is gram negative bacteria and negative of biochemical test

การทดสอบความทนต่อกรดและเกลือน้ำดีของสปอร์แบคทีเรีย

จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดที่ pH 2.0, 3.0 และ 4.0 เป็นเวลา 3 ชม. พบว่าที่สภาวะกรด pH 2.0 ของ *B. aryabhattai* (CKNJh11) และ ไอโซเลต OYNH19 มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด คือ 93.49 และ 91.95% ตามลำดับ (P<0.05) ที่ pH 4.0 ของ *B. aryabhattai* (CKNJh11), ไอโซเลต THPS1 และ ไอโซเลต OYNH19 มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด คือ 90.07, 89.47 และ 90.76% ตามลำดับ (P<0.05) และการทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.1 , 0.3 และ 0.5% พบว่า

ทุกไอโซเลตมีอัตราการรอดชีวิตสูง และทนเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ แต่อัตราการรอดชีวิตไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ **(Table 2)**

Table 2 Tolerance activity of four spores isolates at different pH and Bile salt concentration

Bacteria	Survival rate of isolated bacteria (%)			Survival rate of isolated bacteria (%)		
	pH			Bile salt (%)		
	2.0	3.0	4.0	0.1	0.3	0.5
CKNJh11	93.49±0.60^{aA}	88.88±0.90^{B}	90.07±0.59^{aB}	90.31±2.81	87.41±1.73	91.86±2.44
THPS1	86.17±1.81^{c}	89.35±1.47	89.47±1.10^{a}	87.56±1.79	89.35±1.32	88.35±2.87
PWR01	90.67±0.92^{b}	84.97±3.34	81.98±4.34^{b}	84.00±0.48	84.20±1.30	83.85±0.69
OYNH19	91.95±1.04^{ab}	88.96±0.94^{B}	90.76±0.70^{a}	87.24±1.28	87.70±0.60	86.89±1.09

Values (mean ± SD, n = 3) with different superscripts in each row are significantly different *(P*<0.05).

($^{A, B}$) Uppercase letters in the same row are significantly different between pH for each isolate (*P*<0.05).

($^{a, b, c}$) Lowercase letters in the same column significant different among isolate for each pH and bile salt (*P*<0.05).

การทดสอบการทนความร้อนของสปอร์แบคทีเรีย

จากการทดสอบการทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 50, 70, 80 และ 95 °C เป็นเวลา 30 นาที พบว่าการทดสอบการทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C ของไอโซเลต PWR01 มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด คือ 99.60% (*P*<0.05) ที่อุณหภูมิ 70 °C ของไอโซเลต THPS1 และ PWR01 มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด คือ 90.10 และ 90.79% ตามลำดับ (*P*<0.05) ที่อุณหภูมิ 80 °C ของไอโซเลต PWR01 และ OYNH19 มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด คือ 90.35 และ 91.30% ตามลำดับ (*P*<0.05) และที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ทุกไอโซเลตมีอัตราการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (*P*>0.05) **(Table 3)**

Table 3 Tolerance activity of four spore isolates at different heat temperature

Temperature	Time	Survival rate of isolated bacteria (%)			
(°C)	(min)	CKNJh11	THPS1	PWR01	OYNH19
50	30	91.50±3.99^{bA}	93.96±0.97^{bA}	99.60±0.69^{aA}	92.22±0.18^{bA}
70	30	85.94±1.25^{bB}	90.10±0.93^{aB}	90.79±2.75^{aB}	88.50±0.41^{bA}
80	30	78.41±2.99^{cC}	82.71±2.92^{bC}	90.35±0.54^{aB}	91.30±0.41^{aB}
95	30	72.61±2.07^{D}	71.51±0.00^{D}	71.42±0.00^{C}	70.11±1.99^{C}

Values (mean ± SD, n = 3) with different superscripts in each row are significantly different (*P*<0.05).

($^{A, B, C}$) Uppercase letters in the same column are significantly different temperature (*P*<0.05).

($^{a, b, c}$) Lowercase letters in same row are significant difference between isolate bacteria (*P*<0.05).

การทดสอบความทนต่อไลโซไซม์ของสปอร์แบคทีเรีย

จากผลการทดสอบสปอร์ต่อการทนไลโซไซม์เป็นเวลา 30, 60 และ 120 นาที พบว่าที่การทดสอบการทนต่อไลโซไซม์ เป็นเวลา 30 นาที ทุกไอโซเลตมีอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ที่ไม่แตกต่างกัน (*P*>0.05) การทดสอบในไลโซไซม์เป็นเวลา 60 นาที พบว่าไอโซเลต PWR01 และ OYNH19 มีอัตราการรอดชีวิตของสปอร์แบคทีเรียสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่น โดยมีอัตราการรอด

ชีวิต คือ 90.73 และ 92.95% ตามลำดับ (P<0.05) และที่การทดสอบการทนต่อไลโซไซม์เป็นเวลา 120 นาที พบว่า ไอโซเลต THPS1, PWR01 และ OYNH19 มีอัตราการรอดชีวิตของสปอร์แบคทีเรียสูงที่สุด คือ 91.21, 90.49 และ 90.53% ตามลำดับ (P<0.05) **(Table 4)**

Table 4 Lysozyme tolerance activity of four spore isolates

Lysozyme	Time (min)	Survival rate of isolated bacteria (%)			
		CKNJh11	THPS1	PWR01	OYNH19
50 μg/ml	30	89.15±0.94	$87.88±1.83^{B}$	90.08±0.36	$90.30±1.80^{B}$
	60	$89.00±2.23^{b}$	$90.10±0.84^{bA}$	$90.73±0.27^{a}$	$92.95±0.35^{aA}$
	120	$86.78±0.66^{b}$	$91.21±0.78^{aA}$	$90.49±0.65^{a}$	$90.53±0.24^{aB}$

Values (mean ± SD, n = 3) with different superscripts in each row are significantly different (P<0.05).

($^{A, B}$) Uppercase letters in the same column are significantly different between time for each isolate (P<0.05).

($^{a, b, c}$) Lowercase letters in the same row are significant difference between isolate bacteria (P<0.05)

การผสมสปอร์ของแบคทีเรียในอาหารไก่ และการตรวจสอบความมีชีวิตของสปอร์

จากการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของสปอร์เมื่อผสมในอาหารไก่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างกัน 4, 25 และ 37 °C เป็นเวลา 14 และ 30 วัน หลังการทดสอบเก็บสปอร์ในอาหารไก่เป็นเวลา 14 วัน พบว่า สปอร์ของทั้ง 4 ไอโซเลตมีอัตราการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกันที่อุณหภูมิ 4 และ 37 °C แต่ที่อุณหภูมิ 25 °C พบว่าไอโซเลต THPS1 มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด คือ 97.92% (P<0.05) และหลังการทดสอบเก็บสปอร์ในอาหารไก่เป็นเวลา 30 วัน ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 °C พบว่า สปอร์ของทั้ง 4 ไอโซเลต ยังคงมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่า 70% แต่อัตราการรอดชีวิตของสปอร์ทุกไอโซเลตไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) **(Table 5)**

Table 5 Survival rate of four spore isolates at different condition in chicken feed

Bacteria	Survival rate of isolated bacteria (%)			Survival rate of isolated bacteria (%)		
	14 Day			30 Day		
	4°C	25°C	37°C	4°C	25°C	37°C
CKNJh11	83.09±6.92	$76.19±2.06^{c}$	74.99±3.57	73.80±2.06	77.81±5.54	77.21±5.04
THPS1	$85.41±2.74^{B}$	$97.92±1.87^{aA}$	$77.58±5.38^{C}$	76.90±4.74	75.24±3.23	76.95±4.82
PWR01	74.48±2.83	$74.99±3.57^{c}$	82.65±2.02	79.40±2.06	78.48±2.54	77.53±0.89
OYNH19	$76.54±0.59^{C}$	$93.21±1.05^{bA}$	$80.53±1.95^{B}$	80.76±1.62	75.36±2.73	73.30±4.89

Values (mean ± SD, n = 3) with different superscripts in each row are significantly different (P<0.05)

($^{A, B}$) Uppercase letters in the same row was ($^{a, b, c}$) lowercase letters in the same column indicated significantly different (P<0.05)

วิจารณ์

ในการศึกษาคุณสมบัติและความคงทนของสปอร์บาซิลลัสโพรไบโอติก ในสภาวะต่าง ๆ ของแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต ได้แก่ *B. aryabhattai* (CKNJh11), THPS1, PWR01 และ OYNH19 ซึ่งคัดแยกได้จากดินบริเวณบ่อกุ้ง ดินบ่อน้ำพุร้อน เซรั่มก้อนถ้วยยางพารา และมูลไก่ จากการทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ พบว่าทั้ง 4 ไอโซเลตมีประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ คือ 97.05,

92.21, 92.08 และ 84.58% ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Erdem et al. (2013) และ Ramlucken et al. (2020) พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. สามารถผลิตสปอร์ได้สูงกว่า 80% โดยประสิทธิภาพการผลิตสปอร์ของแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายปัจจัย ได้แก่ สารอาหาร อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง สปอร์ของแบคทีเรียเกิดขึ้นเมื่อสภาวะ แวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ขาดอาหาร ความร้อน หรือความแห้งแล้ง สารเคมี และรังสี เป็นต้น ซึ่งงานวิจัยนี้ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้น เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. มีคุณสมบัติที่ สามารถสร้างสปอร์ซึ่งทนต่ออุณหภูมิสูงและสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี ผลทดสอบการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีพบว่าสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้ถึงค่า pH 4.0 และทนต่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีได้สูงถึง 0.5% โดยทุกไอโซเลต มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 80% สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sookchaiyaporn et al. (2020) ที่ได้นำสปอร์ *Bacillus* sp. KUAQ1 และ *Bacillus* sp. KUAQ2 มาทดสอบการทนต่อกรดและเกลือน้ำดี พบว่าสามารถทนต่อค่า pH ในช่วง 2-9 ได้ดีและสามารถทนค่า pH ในช่วง 2 นานถึง 6 ชม. และสามารถทนต่อกรดเกลือ 0.5, 1.0 และ 2.0% ได้นานถึง 4 ชม. และยังพบว่าในช่วงเวลา 2 ชม. แรก สปอร์ของ *Bacillus* sp. KUAQ1 และ *Bacillus* sp. KUAQ2 สามารถเจริญได้ดีอีกด้วย ผลการทดสอบการทนความร้อนของสปอร์แบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 50, 70, 80 และ 95 °C เป็นเวลา 30 นาที ได้ดี โดยทุกไอโซเลตมีอัตราการรอดชีวิตสูงว่า 70% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Barbosa et al. (2005) ที่ได้นำสปอร์แบคทีเรียมาทดสอบการทนความร้อน พบว่าสามารถทนต่อความร้อนที่ 70-110 °C ได้นาน 30 นาที โดยที่มี อัตราการรอดชีวิตสูงถึง 70-80% และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Larsen et al. (2013) ที่ได้นำสปอร์ของ *B. amyloliquefaciens* มาทดสอบการทนต่อความร้อนซึ่งพบว่าสปอร์สามารถทนความร้อนที่ 99 °C ได้นานถึง 10 นาที และสปอร์ของ *B. amyloliquefaciens* สามารถทนความร้อนได้ถึง 105 °C ได้นานถึง 24 นาที ผลการทดสอบการทนต่อ ไลโซไซม์ของสปอร์แบคทีเรีย 4 ไอโซเลต พบว่าสามารถทนต่อไลโซไซม์ได้ โดยมีอัตราการรอดชีวิตสูงว่า 89% โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ragul et al. (2017) ที่ได้นำสปอร์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปทำการทดสอบการทนต่อไลโซไซม์ โดยนำสปอร์ที่ได้ผสมกับไลโซไซม์ 3 ชม. โดยตรวจอัตราการรอดตายที่ 30 และ 120 นาที ทดสอบพบว่าสปอร์สามารถทนต่อความเข้มข้นของไลโซไซม์ทั้ง 2 ความเข้มข้นได้ดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการทดสอบการผสมสปอร์ของแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลตในอาหารไก่และตรวจสอบความมีชีวิตของสปอร์ พบว่าการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของสปอร์เมื่อผสมในอาหารไก่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างกัน 4, 25 และ 37 °C เป็นเวลา 30 วัน ของแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต พบว่าอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ก็ยังคงสูงกว่า 70% โดย *B.aryabhattai* (CKNJh11) และ THPS1 ในวันที่ 30 ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 °C อัตราการรอดชีวิตของสปอร์ยังคงสูงกว่า 70% ไอโซเลต PWR01 และ OYNH19 ในวันที่ 30 ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 °C อัตราการรอดชีวิตของสปอร์ยังคงสูงกว่า 72% Ramlucken et al. (2020) ได้กล่าวไว้ว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. มีความสามารถในการรอดชีวิตได้ถึง 100% ในสภาวะที่ไม่เอื้ออำนวยของระบบทางเดินอาหารที่สำคัญยังสามารถใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับอาหารสัตว์ เนื่องสามารถผลิตสปอร์ได้มาก สปอร์สามารถคงสภาพการมีชีวิตได้ประมาณ 90% ในระหว่างกระบวนการเก็บ นอกจากนี้ สปอร์เหล่านี้ยังคงปริมาณที่ความเข้มข้น 1×10^9 สปอร์ เมื่อทำเป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกโดยมีอายุการเก็บรักษา 5 ปี นอกจากนี้สปอร์ยังคงมีการรอดชีวิตในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ปีกได้อีกด้วย และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ramlucken et al. (2021) ที่ได้ศึกษาการผลิตและความเสถียรของ โพรไบโอติกจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. หลายสายพันธุ์ สำหรับใช้เป็นผลิตภัณฑ์ในสัตว์ปีก โดยนำสปอร์มาผสมในอาหารไก่เนื้อและนำไปเข้ากระบวนการอัดรีดเป็นเม็ดที่ผ่านอุณหภูมิตั้งแต่ 75 ถึง 80 องศาเซลเซียสแล้วนำมาบดเป็นขนาดต่าง ๆ ตามชนิดของอาหาร นับสปอร์เริ่มต้นและสุดท้ายระหว่างการผสมอาหาร โดยในระหว่างการผสมอาหารพบว่าจำนวนสปอร์ที่นับได้ต่ำสุด 1×10^6 CFU ต่อปริมาณอาหาร 1 ก. ผลการศึกษานี้สนับสนุนการใช้แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp. เป็นโพรไบโอติกในอาหารสัตว์ เนื่องจากมีความเสถียร มีอัตราการรอดของสปอร์สูงในช่วงต่าง ๆ ของกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ และยังแสดงให้เห็นศักยภาพโดยรวมของโพรไบโอติกกลุ่ม *Bacillus* spp. ที่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุป

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพความคงทนของสปอร์แบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลต ได้แก่ *B. aryabhattai* (CKNJh11), THPS1, PWR01 และ OYNH19 ซึ่งมีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสปอร์สูง มีคุณสมบัติเป็น

โพรไบโอติกที่สามารถทนต่อสูงได้ดี สามารถทนต่อสภาวะจำลองของกรดและเกลือน้ำดี ไลโซไซม์ และเมื่อผสมสปอร์ในอาหารไก่ เก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 ℃ เป็นเวลา 30 วัน พบว่าสปอร์ยังคงมีอัตราการรอดชีวิตสูง ทั้งนี้คุณสมบัติโพรไบโอติกของทั้ง 4 ไอโซเลตมีประสิทธิภาพดีในแต่ละด้าน ซึ่งสามารถนำมาพัฒนาและประยุกต์ใช้เป็นโพรไบโอติกทางการเกษตรและอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ต่อไปได้ โดยการนำทั้ง 4 ไอโซเลตมารวมกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพโพรไบโอติกให้ดียิ่งขึ้น

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณโครงการจัดตั้งคณะนวัตกรรมการเกษตรและประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานีที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัย ศูนย์ปฏิบัติการวิทยาศาสตร์และเครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานีที่ได้อนุเคราะห์สถานที่ วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือในการทำงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

พัณณิตา คงแสง และสริตา กาละจิตต์. 2561. การห่อหุ้มสปอร์ของบาซิลลัสที่คัดแยกจากดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อนเพื่อประยุกต์ใช้ในการเกษตร. โครงงานนักศึกษา ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี. สุราษฎร์ธานี.

วราภรณ์ อัปมะโน, อรทัย แดงสวัสดิ์, ธีร ศรีสวัสดิ์ และปฏิมา เพิ่มพูนพัฒนา. 2564. ฤทธิ์ต้านการสร้างไบโอฟิล์มของแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อแบคทีเรียก่อโรคในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. แก่นเกษตร. 49(ฉบับพิเศษ1): 108-115.

คึกฤทธิ์ ศิลาลาย. 2561. โพรไบโอติกที่ใช้ประโยชน์ในปศุสัตว์. เกษตรพระจอมเกล้า. 36(1): 152-160.

อรทัย แดงสวัสดิ์, พัณณิตา คงแสง, สริตา กาละจิตต์, เจษฎา รัตนวุฒิ, พงษ์พิช เพชรสกุลวงศ์ และปฏิมา เพิ่มพูนพัฒนา. 2563. การห่อหุ้มสปอร์บาซิลลัสที่คัดแยกจากดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อน เพื่อใช้เป็นสารเสริมโพรไบโอติกในอาหารไก่ไข่. แก่นเกษตร. 48(1): 227-236.

อรทัย แดงสวัสดิ์. 2563. การคัดแยก และศึกษาคุณสมบัติของบาซิลลัสเพื่อใช้เป็นสารเสริมโพรไบโอติกในไก่ไข่. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี. สุราษฎร์ธานี.

Alkalbani, N. S., M. S. Turner, and M. M. Ayyash. 2019. Isolation, identification, and potential probiotic characterization of isolated lactic acid bacteria and in vitro investigation of the cytotoxicity, antioxidant, and antidiabetic activities in fermented sausage. Microbial Cell Factories. 18(1): 1-12.

Anee, I. J., S. Alam, R. A. Begum, R. M. Shahjahan, and A. M. Khandaker. 2021. The role of probiotics on animal health and nutrition. The Journal of Basic and Applied Zoology. 82(52). 1-16.

Barbosa, T. M., R. Serra Cláudia, R. M. La Ragione, M. J. Woodward, and A. O. Henriques. 2005. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. Applied and Environmental Microbiology. 71(2): 968–978.

Cutting, S. M. 2011. *Bacillus* probiotics. Food Microbiology. 28(2): 214-220.

Elshaghabee, F. M., N. Rokana, R. D. Gulhane, C. Sharma, and H. Panwar. 2017. *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. Frontiers in Microbiology. 8: 1-15.

Erdem, O., M. Gultekin-Ozguven, I. Berktaş, S. Erşan, H. E. Tuna, A. Karadag, B. Ozçelik, G. Guneş, and S. M. Cutting. 2014. Development of a novel synbiotic dark chocolate enriched with *Bacillus indicus* hu36, maltodextrin and lemon fiber: Optimization by response surface methodology. LWT - Food Science and Technology. 56(1): 187–193.

Kavitha, M., M. Raja, and P. Perumal. 2018. Evaluation of probiotic potential of *Bacillus* spp. isolated from the digestive tract of Freshwater Fish *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822). Aquaculture Reports. 11: 59–69.

Konuray, G., and Z. Erginkaya. 2018. Potential use of *Bacillus coagulans* in the Food Industry. Foods. 7(6): 92.

Larsen, N., L. Thorsen, E. N. Kpikpi, B. Stuer-Lauridsen, M. D. Cantor, B. Nielsen, E. Brockmann, P. M. Derkx, and L. Jespersen. 2013. Characterization of *Bacillus* spp. strains for use as probiotic additives in pig feed. Applied Microbiology and Biotechnology. 98(3): 1105–1118.

Li, A. 2019. Isolation and identification of potential *Bacillus* probiotics from free ranging yaks of Tibetan Plateau, China. Pakistan Veterinary Journal. 39(03): 377–382.

Luong, T. T., N. T. Huong, B. T. Ha, P. T. Huong, N. H. Anh, D. T. Huong, Q. T. Van, P. T. Nghia, and N. T. Anh. 2018. Carotenoid producing *Bacillus aquimaris* found in chicken gastrointestinal tracts. Vietnam Journal of Biotechnology. 14(4): 761–768.

Mohammad, B. T., H. I. Daghistani, A. Jaouani, S. Abdel-Latif, and C. Kennes. 2017. Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Jordanian hot springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* isolates as potential producers of thermostable enzymes. International Journal of Microbiology. 1-12.

Mohkam, M., N. Nezafat, A. Berenjian, M. Zamani, F. Dabbagh, R. Bigharaz, and Y. Ghasemi. 2019. Multifaceted toxin profile of *Bacillus* probiotic in newly isolated *Bacillus* spp. from soil rhizosphere. Biologia. 75(2): 309–315.

Nguyen, A. T. V., D. V. Nguyen, M. T. Tran, L. T. Nguyen, A. H. Nguyen, and T.N. Phan. 2015. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* CH16 strain from chicken gastrointestinal tracts for use as a feed supplement to promote weight gain in broilers. Letters in Applied Microbiology. 60(6): 580–588.

Permpoonpattana, P., H. A. Hong, R. Khaneja, and S. M. Cutting. 2012. Evaluation of *Bacillus subtilis* strains as probiotics and their potential as a food ingredient. Beneficial Microbes. 3(2): 127–135.

Ragul, K., I. Syiem, K. Sundar, and P. H. Shetty. 2017. Characterization of probiotic potential of *Bacillus* species isolated from a traditional brine pickle. Journal of Food Science and Technology. 54(13): 4473–4483.

Ramlucken, U., R. Lalloo, Y. Roets, G. Moonsamy, C. J. van Rensburg, and M. S. Thantsha. 2020. Advantages of *Bacillus*-based probiotics in poultry production. Livestock Science. 241: 104215.

Ramlucken, U., S. O. Ramchuran, G. Moonsamy, C. J. van Rensburg, M. S. Thantsha, and R. Lalloo. 2021. Production and stability of a multi-strain *Bacillus* based probiotic product for commercial use in Poultry. Biotechnology Reports. 29: 1-8.

Sookchaiyaporn, N., P. Srisapoome, S. Unajak, and N. Areechon. 2020. Efficacy of *Bacillus* spp. isolated from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linn. on its growth and immunity, and control of pathogenic bacteria. Fisheries Science. 86(2): 353–365.