ผลของสารเสริมชีวนะ *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ต่อ
สมรรถภาพการเจริญเติบโต การย่อยได้ของสารอาหาร จำนวนจุลชีพในไส้ตันและ
สัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กในไก่เนื้อ

นางสาวศศิ วิมล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF PROBIOTICS *BACILLUS SUBTILIS* AND *BACILLUS LICHENIFORMIS* SUPPLEMENTATION ON GROWTH PERFORMANCE, NUTRIENT DIGESTIBILITY, CECAL MICROBIOTA AND SMALL INTESTINAL MORPHOLOGY IN BROILERS.

Miss Sasi Vimon

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Animal Nutrition
Department of Animal Husbandry
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารเสริมชีวนะ *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโต การย่อยได้ของสารอาหาร จำนวนจุลชีพในไส้ตันและสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กในไก่เนื้อ
โดย	นางสาวศศิ วิมล
สาขาวิชา	อาหารสัตว์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. จักรกริศน์ เนื่องจำนงค์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. กฤษ อังคนาพร

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ สมชาย จันทร์ผ่องแสง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. จักรกริศน์ เนื่องจำนงค์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. กฤษ อังคนาพร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. อุตรา จามีกร)

.....กรรมการ
(อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. อนงค์นาฏ อัศวชีพ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ สร้อยสุวรรณ)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ศศิ วิมล : ผลของสารเสริมชีวนะ *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโต การย่อยได้ของสารอาหาร จำนวนจุลชีพในไส้ตันและสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กในไก่เนื้อ (EFFECTS OF PROBIOTICS *BACILLUS SUBTILIS* AND *BACILLUS LICHENIFORMIS* SUPPLEMENTATION ON GROWTH PERFORMANCE, NUTRIENT DIGESTIBILITY, CECAL MICROBIOTA AND SMALL INTESTINAL MORPHOLOGY IN BROILERS.) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. น.สพ. ดร. จักรกริศน์ เนื่องจำนงค์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. น.สพ. ดร. กฤษ อังคนาพร, 64 หน้า.

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมสารเสริมชีวนะ (*Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis*) ต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโต การย่อยได้ของสารอาหาร จำนวนจุลชีพในไส้ตันและ สัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กในไก่เนื้อ โดยทำการศึกษาในไก่เนื้อเพศเมียพันธุ์ Ross 308 อายุ 1 วันจำนวน 288 ตัว ทำการสุ่มไก่ออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 6 ซ้ำๆ ละ 12 ตัว โดยเลี้ยงในโรงเรือนเปิด ภายในสภาพแวดล้อมเดียวกันจนถึงอายุ 42 วันและใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) อาหารที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 4 สูตร คือ 1) อาหารควบคุม 2) อาหารควบคุมเสริมด้วยยาปฏิชีวนะ Amoxycillin 200 พีพีเอ็ม (ppm) 3) อาหารควบคุมเสริมด้วย *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* 2.5 x 10^7โคโลนีต่อกิโลกรัม (CFU/kg) อาหาร และ 4) อาหารควบคุมเสริมด้วย *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* 5 x 10^7โคโลนีต่อกิโลกรัม (CFU/kg) อาหาร ทำการเก็บลำไส้เล็กส่วนเจจูนัมเพื่อวัดค่าสัณฐานวิทยา รวมถึงพารามิเตอร์อื่นๆ ได้แก่ สมรรถภาพการเจริญเติบโต สัมประสิทธิ์การย่อยได้บริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย จำนวนจุลินทรีย์ในไส้ตันและ ค่า pH ในลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม โดยทำการเก็บข้อมูลรวมทั้งหมด 2 ช่วงเวลาได้แก่ ช่วงวันที่ 21 และ 42 ของการทดลอง

ผลการศึกษาเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 42 วันพบว่า อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันและ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวของไก่กลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ Amoxycillin และกลุ่มที่ได้รับการเสริมชีวนะ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* ทั้งสองกลุ่ม ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P <0.05) แต่ค่าปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อวันไม่มีความแตกต่างกัน (P>0.05) การย่อยได้บริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย พบว่าในวันที่ 42 ของการทดลองกลุ่มที่ได้รับสารเสริมชีวนะที่ระดับ 5 x 10^7โคโลนีต่อกิโลกรัม (CFU/kg) อาหารมีค่าการย่อยได้ของน้ำหนักวัตถุแห้ง และโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P <0.05) ในขณะที่ค่าการย่อยได้ของไขมันพบว่าทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน ในวันที่ 21 ของการทดลอง ไก่กลุ่มที่ได้รับสารเสริมชีวนะทั้งสองระดับมีจำนวนเชื้อ Lactic acid bacteria และค่า *Lactobacillus* : *E. coli* ratio เพิ่มขึ้น (P <0.05) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนวันที่ 42 ของการทดลอง ไก่ที่ได้รับสารเสริมชีวนะที่ระดับ 5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัม (CFU/kg) อาหาร มีจำนวนเชื้อ *Bacillus* spp., Lactic acid bacteria และค่า *Lactobacillus* : *E. coli* ratio เพิ่มขึ้น (P <0.05) และมีประชากร E. coli ลดลง (P< 0.05) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามไม่มีการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. ในทุกกลุ่มการทดลอง ผลค่าสัณฐานวิทยาในลำไส้ พบว่าในวันที่ 21 และ 42 ของการทดลองสารเสริมชีวนะ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* ทั้งสองระดับมีความสูงของวิลไลเพิ่มขึ้น (P <0.05) นอกจากนี้อัตราส่วนของวิลไลต่อคริปท์ในกลุ่มที่เสริม *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* ที่ระดับ 5 x 10^7โคโลนีต่อกิโลกรัม (CFU/kg) อาหารดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (P <0.05) ส่วนค่า pH ในลำไส้พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในทุกกลุ่มการทดลอง (P>0.05) ผลการทดลองสรุปได้ว่า การเสริม *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* ที่ระดับ 5 x 10^7โคโลนีต่อกิโลกรัม (CFU/kg) อาหาร สามารถปรับปรุงความสมดุลของจุลินทรีย์ในไส้ตัน สัณฐานวิทยาในลำไส้เล็ก และการย่อยได้บริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย อย่างไรก็ดีการเสริมสารเสริมชีวนะทั้งสองระดับสามารถเพิ่มสมรรถภาพการเจริญเติบโตในไก่เนื้อได้ไม่แตกต่างกัน

ภาควิชา สัตวบาล ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา อาหารสัตว์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5675323031 : MAJOR ANIMAL NUTRITION
KEYWORDS: BACILLUS LICHENIFORMIS, BACILLUS SUBTILIS, BROILERS, CECAL MICROBIOTA, GROWTH PERFORMANCE, 64 PROBIOTICS

SASI VIMON: EFFECTS OF PROBIOTICS *BACILLUS SUBTILIS* AND *BACILLUS LICHENIFORMIS* SUPPLEMENTATION ON GROWTH PERFORMANCE, NUTRIENT DIGESTIBILITY, CECAL MICROBIOTA AND SMALL INTESTINAL MORPHOLOGY IN BROILERS. . ADVISOR: ASSOC. PROF. CHACKRIT NUENGJAMNONG, CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. KRIS ANGKANAPORN, pp.

The experiment aims to investigate the effects of supplementing probiotics (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) on growth performance, ileal digestibility, cecal microbiota and small intestinal morphology in broilers. Two hundred and eighty-eight, day-old female Ross-308 broiler chicks were randomly allotted to 4 treatments with six replicates of 12 birds on the basis of equal average BW in a completely randomized design. Dietary treatments were T1) basal diet (control), T2) basal diet supplemented with 200 ppm Amoxycillin, T3) basal diet supplemented with *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* at the level of 2.5 x 10^7 CFU/kg feed and T4) basal diet supplemented with *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* at the level of 5 x 10^7 CFU/kg feed. Jejunum was collected to investigate small intestinal morphology. In addition, growth performance, ileal digestibility, cecal microbiota and pH in jejunum were determined.

Supplementation of Amoxycillin (T2) and probiotics (T3 and T4) improved ($P < 0.05$) average daily gain and feed conversion ratio but there was no significant difference in average daily feed intake ($P>0.05$) at d 42. Diet contained probiotics at the level of 5x10^7 CFU/kg feed increased ileal dry matter and protein digestibility ($P<0.05$). In addition, there was no difference in ileal fat digestibility among groups ($P>0.05$). At d 21 birds supplemented with *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* in both groups showed the higher numbers of caecal Lactic acid bacteria and *Lactobacillus*: *E. coli* ratio. Moreover, at d 42 birds supplemented with probiotics at the level of 5x10^7 CFU/kg feed higher numbers of caecal Lactic acid bacteria, *Bacillus* spp and *Lactobacillus*: *E. coli* ratio in T3 and T4. In addition, caecal *E. coli* count was decreased ($P< 0.05$) in broilers fed diet supplemented with probiotics at the level of 5x10^7 CFU/kg feed. However, *Salmonella* spp. was not detected in all groups. Birds supplemented with the probiotics in both groups had higher villus height ($P<0.05$) than other groups. Moreover, supplementation of probiotics at the level of 5x10^7 CFU/kg feed increased ($P < 0.05$) villus height to crypt depth ratio in jejunum. No significant difference was detected ($P> 0.05$) for pH in jejunum. In conclusion, diets composed of probiotics (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) at the level of 5x10^7 CFU/kg feed improve the balance of intestinal microbiota, small intestinal morphology and ileal digestibility. Moreover, there was no significant difference in growth performance between probiotics at both levels.

Department:	Animal Husbandry	Student's Signature	.....
Field of Study:	Animal Nutrition	Advisor's Signature	.....
Academic Year:	2014	Co-Advisor's Signature	.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รศ. น.สพ.ดร. จักรกริศน์ เนื่องจำนงค์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ แก้ปัญหาด้านการวิจัย หาทุนสนับสนุนการวิจัย การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ การวิเคราะห์ข้อมูล แก้ไขและเรียบเรียงวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์และสำเร็จไปด้วยดี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ. น.สพ.ดร. กฤษ อังคนาพร รวมทั้งคณะกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจ แก้ไขวิทยานิพนธ์ ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณหน่วยงานและผู้มีรายนามต่อไปนี้ที่ให้ความอนุเคราะห์ และช่วยให้การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงได้

1) ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ทำการทดลองภาคสนาม และห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์ทางเคมี

2) หน่วยชีวเคมี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือทางห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์ทางเคมี

3) ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือทางห้องปฏิบัติการในการวิเคราะห์สัณฐานวิทยาในลำไส้

4) บริษัท เค เอ็ม พี ไบโอเทค จำกัด จังหวัดชลบุรีที่ให้ความอนุเคราะห์เงินทุนและสารเสริมชีวนะในการทดลอง

5) บริษัท เอ อี เค บรีดเดอร์ฟาร์ม ที่ให้ความอนุเคราะห์ไก่ทดลอง

6) บริษัท พนัสโภคภัณฑ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์อาหารทดลอง

7) คณาจารย์ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและให้ความรู้กับข้าพเจ้าตั้งแต่อดีตจวบจนปัจจุบัน

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ขอบคุณน้องสาว ที่คอยให้กำลังใจและส่งเสริมการศึกษาของข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา ขอบคุณสำหรับมิตรภาพ กำลังใจและความช่วยเหลือทั้งหมดจากเพื่อนและรุ่นพี่ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ธุรการ ภาควิชาสัตวบาลทุกท่าน ที่คอยให้คำปรึกษาและแนะนำทั้งการทดลองภาคสนาม การวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยเป็นอย่างดี ทำให้การทำวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

บทที่ 1 บทนำ 8

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 10

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 23

3.4 การเก็บข้อมูล 25

การวิเคราะห์ข้อมูล 33

บทที่ 4 ผลการทดลอง 34

บทที่ 5 วิจารณ์และสรุป 43

สรุปผลการทดลอง 50

รายการอ้างอิง 52

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 64

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 1 บทนำ

ปัจจุบันธุรกิจการเลี้ยงไก่เนื้อได้เข้ามามีบทบาทสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศไทย ทั้งในด้านการส่งออกและการบริโภคภายในประเทศ โดยในด้านการส่งออกมีสัดส่วนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในปี พ.ศ. 2557 ประเทศไทยส่งออกเนื้อไก่และผลิตภัณฑ์รวม 545,802 ตันคิดเป็นมูลค่ากว่า 73,497 ล้านบาท (สำนักงานการค้าต่างประเทศ, 2558) ซึ่งตลาดส่งออกที่สำคัญของไทยได้แก่ญี่ปุ่นและสหภาพยุโรป

จากสภาวะการแข่งขันที่สูงขึ้นในตลาดโลก จึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตให้มีปริมาณมากขึ้นเพื่อให้ตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคและ สำหรับการส่งออกนั้นการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงไก่เพื่อการส่งออกนั้นถือว่าเป็นปัญหาที่สำคัญเนื่องจากอาจทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคมีการพัฒนาจนเชื้อเกิดการดื้อยาได้ และหากมีการตกค้างในเนื้อไก่อาจจะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค (Ahmad, 2006) จากมาตรการป้องกันความปลอดภัยผู้บริโภคของสหภาพยุโรปซึ่งเป็นตลาดส่งออกที่สำคัญ ได้มีนโยบายปฏิเสธการนำเข้าไก่ที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะเช่น Avopacin, Tylosin, Virginiamycin, Bacitracin และ Spiramycin (Carol et al., 2011) เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในอาหารนั้น ก่อให้เกิดผลกระทบโดยตรงต่อการส่งออกไก่ของไทยเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อหาสิ่งทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะดังกล่าว

การเสริมสารเสริมชีวนะ (Probiotics) ในผลิตภัณฑ์อาหารไก่เป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถแก้ปัญหาการใช้ยาปฏิชีวนะได้ โดยสารเสริมชีวนะต้องสามารถเจริญเติบโต มีชีวิตรอดจากสภาวะต่างๆ ในกระบวนการผลิตอาหาร และมีจำนวนในผลิตภัณฑ์อย่างน้อย 10^6-10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัม (CFU/kg) (FAO/WHO, 2001) ทั้งนี้สารเสริมชีวนะเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และปลอดภัยต่อผู้บริโภค มีคุณสมบัติในการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารโดยการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค (Chandramouli et al., 2004) จึงช่วยให้ระบบการย่อยอาหารของไก่ดีขึ้น สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันทำให้ไก่มีสุขภาพดีและมีประสิทธิภาพการใช้อาหารที่ดี (Ahmad, 2006) อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพของสารเสริมชีวนะจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น การคัดเลือกสายพันธุ์ ระดับที่ใช้ทดลอง ความสามารถของสายพันธุ์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อม และจำนวนตัวที่มีชีวิต (Hong et al., 2005) โดยแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp. มีการนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะกันมาก เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทำให้ทนความร้อน รังสี pH ที่เป็นกรดหรือด่างรุนแรง สามารถทนต่อสภาพความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร และพิษจากสารเคมีได้ดี (Nicholson et al., 2000) นอกจากนี้สปอร์ยังคงทำงานได้แม้จะต้องผ่านเครื่องอัดเม็ดอาหารที่มีความร้อนและความดันสูง จึงมั่นใจได้ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ทำงานได้ดีในตัวสัตว์ อย่างไรก็ตามข้อมูลที่

เกี่ยวข้องกับการใช้สารเสริมชีวนะกลุ่ม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ในไก่เนื้อ ในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังกล่าวไปทดลองใช้ในอาหารไก่เนื้อเพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิต และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อในประเทศไทยได้ ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารเสริมชีวนะ *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโต การย่อยได้ของสารอาหาร จำนวนจุลชีพในไส้ตัน และสัณฐานวิทยาในลำไส้ของไก่เนื้อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ระบบทางเดินอาหารของไก่

1.ปาก (mouth)

ไก่จะมีลักษณะของปากที่แตกต่างจากสัตว์ชนิดอื่นๆ คือ ไก่จะไม่มีริมฝีปาก ไม่มีฟันและแก้ม แต่จะมีปากยื่นยาวออกมาเป็นจะงอยซึ่งใช้ทำหน้าที่จิกและฉีกอาหารเข้าปาก ลิ้นของไก่มีลักษณะแข็ง รูปร่างคล้ายหัวลูกศรทำหน้าที่ในการบังคับหรือดันให้อาหารไหลลงสู่หลอดอาหาร ภายในปากของไก่จะมีต่อมน้ำลายอยู่บริเวณด้านข้างทั้งสองข้าง ทำหน้าที่ผลิตน้ำลายที่มีฤทธิ์เป็นด่างอ่อนๆ ทำให้อาหารเปียกชื้นและอ่อนนุ่ม ประกอบไปด้วยเอนไซม์ ptyalin (amylase) ซึ่งใช้ในการย่อยแป้งและเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล อย่างไรก็ตามการย่อยในปากเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยเนื่องจากอาหารจะอยู่ในปากเพียงระยะสั้นๆ อาหารส่วนใหญ่จะถูกย่อยในอวัยวะส่วนอื่นๆ (North, 1984)

2.หลอดอาหาร (esophagus or gullet)

เป็นท่อกล้ามเนื้อทำหน้าที่ในการลำเลียงอาหารจากปากไปยังกระเพาะ ตอนปลายของหลอดอาหารจะขยายออกเป็นกระเพาะพัก ซึ่งมีในสัตว์ปีกทุกชนิด หลอดอาหารมีลักษณะพิเศษคือสามารถขยายตัวได้มาก (North, 1984)

3.กระเพาะพัก (crop)

หลังจากที่อาหารผ่านจากปาก จะเคลื่อนลงสู่หลอดอาหารและจะเข้าสู่กระเพาะพักซึ่งเป็นหลอดอาหารส่วนที่ขยายใหญ่ขึ้น ทำหน้าที่เป็นที่พักอาหารไว้ชั่วคราว เพื่อให้อาหารนิ่มลงโดยอาหารจะถูกพักไว้เป็นเวลานานเท่าใดนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของอาหาร ปริมาณของอาหารที่ไก่กินและปริมาณอาหารที่อยู่ในกระเพาะบดในกระเพาะพักนั้นจะไม่มีการผลิตเอนไซม์ใดๆออกมา (North, 1984)

4.กระเพาะแท้ (true stomach or proventriculus)

เป็นอวัยวะที่มีลักษณะเป็นกระเปาะ อยู่ทางด้านหลังของกระเพาะพักอยู่ในตำแหน่งก่อนกระเพาะบดมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า glandular stomach เพราะเป็นส่วนที่เต็มไปด้วยต่อมน้ำย่อย กระเพาะส่วนนี้จะมีการสร้างน้ำย่อย (gastric juice) ซึ่งประกอบไปด้วยเอนไซม์เพปซิน (pepsin) และกรดเกลือ (hydrochloric acid) โดยเอนไซม์เพปซิน ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนโมเลกุลใหญ่ให้มีขนาดที่เล็กลง และกรดเกลือทำหน้าที่ปรับสภาพความเป็นกรดด่างของอาหารโดยเปลี่ยนอาหารในสภาพที่เป็นด่าง ให้เป็นกรดและช่วยในการย่อยโปรตีน เนื่องจากกระเพาะส่วนนี้มีขนาดเล็กและสั้น ทำให้

อาหารผ่านไปสู่กระเพาะบดอย่างรวดเร็ว การย่อยจะเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยแต่การย่อยจะมีต่อเนื่องมากขึ้นไปขณะที่อาหารผ่านเข้าไปอยู่ในกระเพาะบด (North, 1984)

5.กระเพาะบด (gizzard or ventriculus)

เป็นอวัยวะที่มีผนังหนาและมีกล้ามเนื้อที่แข็งแรงจึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า muscular stomach มีรูปร่างคล้ายก้อนกลมกล้ามเนื้อสีแดงค่อนข้างกลมแบน เชื่อมต่อระหว่างกระเพาะบดกับลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ประกอบด้วยกล้ามเนื้อ 2 คู่ ผิวภายในประกอบด้วยเยื่อบุหนา ซึ่งจะมีการสึกหรอหรือเปลี่ยนแปลงใหม่อยู่เสมอ กระเพาะบดนี้ทำหน้าที่บดเคี้ยวอาหารแทนฟัน ทำให้อาหารมีขนาดเล็กลง เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวให้กับอาหารซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อย ภายในกระเพาะบดจะพบว่ามีก้อนกรวดและก้อนหินก้อนเล็กๆอยู่ เกิดจากการจิกกินของไก่เองหรือจากการเสริมลงไปในอาหารของไก่ซึ่งมีประโยชน์ในการช่วยบดย่อยอาหารเนื่องจากกระเพาะส่วนนี้ไม่มีการผลิตเอนไซม์ออกมา ในขณะที่กระเพาะบดมีอาหารอยู่ กล้ามเนื้อจะทำงานอยู่ตลอดเวลาจนกว่ากระเพาะจะว่าง เมื่อมีอาหารเข้ามาใหม่จะมีการเริ่มทำงานใหม่ อาหารที่ถูกบดละเอียดแล้วจะถูกผสมคลุกเคล้ากับน้ำย่อยที่ได้จากกระเพาะแท้ อาหารที่ละเอียดแล้วจะผ่านกระเพาะบดไปสู่ลำไส้เล็กภายใน 2-3 นาที แต่ถ้าอาหารที่ไก่กินเป็นอาหารที่มีขนาดใหญ่ หยาบ อาจอยู่ในกระเพาะบดนานถึง 4-5 ชั่วโมงได้ (North, 1984)

6.ลำไส้เล็ก (small intestine)

เป็นท่อทางเดินอาหารที่ต่อจากกระเพาะบด ไปสู่ลำไส้ใหญ่ แบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) และลำไส้เล็กส่วนท้าย (ileum) ลำไส้เล็กส่วนต้นเป็นท่อทางเดินอาหารที่มีลักษณะโค้งเป็นลูป (loop) เรียกว่า duodenal loop เป็นที่ยึดของตับอ่อน (pancreas) ซึ่งตับอ่อนจะทำหน้าที่ในการผลิตน้ำย่อย (pancreatic juice) เข้าสู่ลำไส้เล็ก ซึ่งจะประกอบไปด้วนเอนไซม์อะไมเลส (amylase) ทริปซิน (trypsin) และไลเปส (lipase) น้ำย่อยจากตับอ่อนมีลักษณะค่อนข้างเป็นด่าง จึงช่วยให้สภาพในลำไส้เป็นกลาง ช่วยให้การย่อยอาหารเกิดได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังมีน้ำดีที่ผลิตจากตับและเก็บไว้ในถุงน้ำดี ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวสีเขียวเหลือง มีความเป็นด่างจะผ่านเข้าไปสู่ส่วนล่างของลำไส้ทางท่อน้ำดี น้ำดีมีหน้าที่ช่วยปรับสภาพความเป็นกรดด่างของอาหารให้เป็นกลางและทำให้ไขมันกระจายตัวได้ดี กระบวนการย่อยจะเสร็จสิ้นสมบูรณ์ในส่วนของลำไส้เล็ก ซึ่งในไก่ที่โตเต็มวัยมีความยาวประมาณ 150 เซนติเมตร (North, 1984)

7.ไส้ตัน (ceca)

เป็นลำไส้ตัน 2 อันที่มีลักษณะคล้ายกับถุงเล็กๆ ตอนปลายขยายใหญ่กว่าตอนโคน มีความยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร เชื่อมต่อกับท่อทางเดินอาหารบริเวณรอยต่อระหว่างลำไส้เล็กกับลำไส้ใหญ่ ภายในไส้ตันเต็มไปด้วยอาหารจากลำไส้เล็กและจะมีอาหารเข้าออกอยู่ตลอดเวลา ไส้ตันไม่มีหน้าที่สำคัญในการย่อยอาหารโดยเฉพาะในไก่ที่กินอาหารผสมย่อยง่าย แต่ในไก่ที่กินอาหารที่มีใยอาหารสูง การย่อยอาหารอาจเกิดขึ้นได้บ้างโดยอาศัยจุลินทรีย์ในไส้ตันเป็นตัวช่วย นอกจากนี้ไส้ตันอาจช่วยดูดซึมน้ำจากอาหารได้บ้างเล็กน้อย (North, 1984)

8.ลำไส้ใหญ่ (large intestine or rectum or colon)

อยู่ต่อจากลำไส้เล็กและสิ้นสุดที่ทวารร่วม ในไก่ลำไส้ใหญ่มีขนาดใหญ่กว่าลำไส้เล็กถึง 2 เท่า แต่มีความยาวสั้นมากคือ มีความยาวเพียง 10 เซนติเมตรเท่านั้น กระบวนการย่อยอาหารในลำไส้เล็กอาจจะต่อเนื่องถึงลำไส้ใหญ่ กากอาหารหรืออาหารที่ผ่านการย่อยแล้วและอาหารบางส่วนที่ไม่ถูกย่อยหรือย่อยไม่ได้จะเคลื่อนตัวมาอยู่ในลำไส้ส่วนนี้เพื่อการขับถ่ายออก นอกจากนี้จะมีการดูดซึมน้ำออกจากกากอาหารเข้าสู่ร่างกายทำให้กากอาหารมีลักษณะแห้ง (North, 1984)

9.ทวารร่วม (cloaca)

เป็นอวัยวะส่วนที่อยู่ปลายสุดของระบบการย่อยอาหารของไก่ เป็นแหล่งรวมของสิ่งต่างๆ ก่อนจะออกนอกตัวไก่ผ่านทางทวารหนัก (vent) ของไก่ รวมทั้งอุจจาระ ปัสสาวะและไข่ของแม่ไก่ ถ้าเปิดทวารร่วมจะเห็นช่องอุจจาระของลำไส้ใหญ่อยู่ทางขวาและช่องไข่ออกอยู่ทางด้านซ้ายของตัวไก่ (North, 1984)

Chulalongkorn University

เนื่องจากทางเดินอาหารของไก่มีหลายส่วนทำให้มีค่า pH แตกต่างกันออกไปดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่า pH ในทางเดินอาหารของไก่

ตำแหน่ง (Position)	pH
Crop	4.00-6.30
Proventriculus	3.17-4.80
Gizzard	2.5-4.74
Duodenum	5.70-6.00
Jejunum	5.80-5.90
Ileum	6.30-6.40
Rectum or colon	6.30-6.40
Ceca	5.70-8.40
Cloaca	5.40-8.40

ที่มา: (Sturkie, 1976)

จากตารางที่ 1 พบว่า pH ในทางเดินอาหารของไก่แต่ละส่วนมีความแตกต่างกันโดยอยู่ในช่วง 2.5-8.4 อย่างไรก็ตาม pH ของน้ำย่อยในทางเดินอาหารไก่โดยเฉพาะส่วนกระเพาะแท้และกระเพาะบด สามารถลดต่ำลงถึง 0.5-2.0 (Sturkie, 1976)

จุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสัตว์ปีก

ในทางเดินอาหารของสัตว์ปีกประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิด โดยลูกไก่ที่เพิ่งฟักออกจากไข่จะปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร แต่จะได้รับจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น อาหาร วัสดุรองพื้น เป็นต้น ทำให้มีการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์ต่างๆ (Karpinska et al., 2001) นอกจากนี้พบว่าทางเดินอาหารแต่ละส่วนของไก่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ในส่วนของกระเพาะพักจะพบจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus* spp. เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเกาะอยู่บนเยื่อบุของกระเพาะพัก ส่วนที่กระเพาะแท้และกระเพาะบด ตรวจพบจุลินทรีย์ได้น้อยชนิด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากภาวะความเป็นกรดค่อนข้างสูง (pH1-2) (Barrow, 1994) ในส่วนของลำไส้เล็กสามารถตรวจพบจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. และจุลินทรีย์ที่สร้างกรดแลคติก โดยพบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus* spp. จะมีปริมาณมากที่สุดในลำไส้เล็กส่วนปลายโดยเฉลี่ย 10^{12} - 10^{15} โคโลนีต่อกรัม (CFU/g) (ธวัชชัยและคณะ 2547) ไส้ตันเป็นส่วนของทางเดินอาหารมีจุลินทรีย์เป็นจำนวนมาก ซึ่งตรวจพบได้มากกว่า 200 ชนิด ในไส้ตันไก่แรกเกิดถึงอายุ 3 วัน จุลินทรีย์ที่พบมากที่สุดคือกลุ่ม *Enterococcus* spp. และเมื่อไก่มีอายุตั้งแต่ 2 สัปดาห์ขึ้นไป จะตรวจพบจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacteroides*spp. และ *Eubacterium*spp. เพิ่มขึ้น (Paul et al., 2000)

จุลินทรีย์ในทางเดินอาหารสามารถแบ่งตามผลต่อสุขภาพสัตว์ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ดังนี้

1. ประเภทที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic microflora) จัดเป็นกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์เช่น *E.coli* หรือ *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดอาการท้องร่วง ซึ่งแบคทีเรียที่ให้โทษเหล่านี้จะเจริญได้ดีในทางเดินอาหารของสัตว์อายุน้อยมากกว่าสัตว์ที่โตเต็มที่แล้ว และความเครียดต่างๆเป็นปัจจัยที่ส่งเสริมให้แบคทีเรียเหล่านี้เจริญเติบโตได้ดี ทำให้เกิดภาวะท้องร่วงและอาหารไม่ย่อยโดยมีกลไกดังนี้

1.1 แบคทีเรียเหล่านี้ย่อยสลายโปรตีน (proteolysis) ในทางเดินอาหารเพื่อการดำรงชีพ และจากกระบวนการย่อยสลายโปรตีนจะทำให้ได้แอมโมเนีย (NH_3) ซึ่งเป็นพิษโดยตรงต่อลำไส้

1.2 ทำให้เกิดกระบวนการดีคาร์บ็อกซิเลชัน (decarboxylation) ของไทโรซีน (tyrosine) เป็นไทรามีน (tyramine) ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้เส้นเลือดฝอยบริเวณลำไส้หดตัว (vasoconstriction) ทำให้เลือดไปเลี้ยงผนังลำไส้ลดลง ผนังลำไส้อ่อนแอ การดูดซึมอาหารจึงน้อยลง

1.3 ทำให้เกิดกระบวนการดีคอนจูเกชัน (deconjugation) ของน้ำดี ส่งผลให้น้ำดีสูญเสียประสิทธิภาพในการย่อยไขมัน การดูดซึมหน่วยย่อยของกรดไขมัน (fatty acid) ลดลง

2. ประเภทที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogenic microflora) พวกนี้เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และยังทำหน้าที่ควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคมิให้มีมากเกินไปจนเป็นอันตรายต่อร่างกาย หากร่างกายปราศจากจุลินทรีย์เหล่านี้ร่างกายจะอ่อนแอและเกิดโรคได้ง่ายซึ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei*, *Streptococcus themophilus* และ *Bacillus subtilis* เป็นต้น

จากการศึกษาที่ผ่านมา สารเสริมชีวนะสามารถยับยั้ง *E. coli* และ *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่มักเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารของไก่ ทำให้ส่งผลดีต่อการลดอัตราความเสี่ยงในการติดเชื้อทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *E. coli* จัดเป็นเชื้อหนึ่งที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ เพราะนอกจากจะก่อให้เกิดโรคและทำให้ไก่ตายแล้ว ยังมีผลเสียต่อการเจริญของลูกไก่และมีผลเสียต่อคุณภาพของซากไก่อีกด้วย (วรการและคณะ 2550ก) ทั้งนี้เกรียงศักดิ์ (2533) รายงานว่า ไก่กระทงมีอัตราการเป็นโรคติดเชื้อจาก *E. coli* มากถึง 81 เปอร์เซ็นต์ในช่วงอายุ 25-32 วัน สำหรับ *Salmonella* spp. พบว่า เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดปัญหาในการส่งออกเนื้อไก่และผลิตภัณฑ์จากเนื้อไก่ไปแข่งขันในตลาดโลก เนื่องจากประเทศคู่ค้าจะไม่รับสินค้าที่ปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* spp. ทั้งนี้เนื่องจากไก่และไข่ถูกจัดว่าเป็นแหล่งของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่สำคัญที่สุดแหล่งหนึ่ง เพราะไก่มีความชุก (prevalence) ในการติดเชื้อดังกล่าวสูง ประกอบกับมีการเลี้ยงจำนวนมากเพื่อการบริโภคทั่วโลก โดยโรคในไก่ที่เกิดจาก *Salmonella* spp. แบ่งออกเป็น 3 โรค ได้แก่ โรคขี้ขาว (pullorum disease) โรคไทฟอยด์ (fowl typhoid) และโรคพาราไทฟอยด์ (paratyphoid) ซึ่งเชื้อที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคพาราไทฟอยด์ คือ *Salmonella* Enteritidis และ

Salmonella Typhimurium และเชื้อกลุ่มดังกล่าวยังส่งผลต่อสุขภาพอนามัยของมนุษย์ โดยอาจก่อให้เกิดอาการป่วยที่รุนแรงและอาจทำให้ผู้บริโภคเสียชีวิตได้ (Murry et al., 2004) ดังนั้นการนำสารเสริมชีวนะที่ผลิตได้ไปเสริมในอาหารไก่กระทงจึงอาจช่วยลดความเสี่ยงจากอัตราการติดเชื้อและอัตราการตายของไก่ที่เกิดจาก *Salmonella* spp. และ *E. coli* อีกทั้งยังช่วยให้ประเทศลดอัตราการสูญเสียมูลค่าการส่งออกเนื้อไก่ไปต่างประเทศได้ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มสมรรถภาพในการผลิตของไก่ได้ โดยไม่ทำให้เกิดการตกค้างของสารอันตรายในเนื้อไก่ที่ใช้เป็นอาหารมนุษย์ซึ่งจะสร้างความปลอดภัยทางด้านอาหาร (food safety) ให้แก่ผู้บริโภคอีกด้วย

ปัจจุบันได้นำจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มาใช้ในรูปของสารเสริมชีวนะผสมในอาหารของคนและสัตว์ ซึ่งจะกล่าวรายละเอียดของสารเสริมชีวนะดังต่อไปนี้

สารเสริมชีวนะ (probiotics)

สารเสริมชีวนะเป็นคำในภาษากรีกแปลว่าเพื่อชีวิต (Gibson and Fuller, 2000) ซึ่งนำมาใช้เป็นครั้งแรกในรายงานการวิจัยของ Lilly และ Stillwell (1965) โดยกล่าวว่า สารเสริมชีวนะเป็นสารชนิดหนึ่งที่จุลินทรีย์ผลิตออกมาและสามารถช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งได้ ซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงกันข้ามกับยาปฏิชีวนะที่ทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิดในระบบทางเดินอาหาร รวมทั้งจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ที่มีประโยชน์ด้วย ต่อมา Fuller (1989) ได้ให้คำจำกัดความใหม่ว่าสารเสริมชีวนะเป็นจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตใช้เป็นอาหารเสริม (feed supplement) มีผลช่วยปรับระดับความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ จากนั้นก็มีการให้คำจำกัดความของสารเสริมชีวนะที่หลากหลาย ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าสารเสริมชีวนะเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อบริโภคเข้าไปแล้วสามารถทำให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายผู้บริโภคในด้านที่อาหารทั่วๆ ไปให้ไม่ได้ นั่นคือสามารถสนับสนุนและส่งเสริมสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่โดยกระตุ้นภูมิคุ้มกันและก่อให้เกิดความสมดุลทางโภชนะและจุลินทรีย์ในลำไส้ (Isolauri et al., 2004)

จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ถูกนำมาศึกษาโดยพิจารณาจากความสามารถในการส่งผลดีต่อสุขภาพของตัวสัตว์ซึ่งจุลินทรีย์ที่นิยมใช้เป็นสารเสริมชีวนะในปัจจุบันประกอบด้วยทั้งเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อราหลากหลายสายพันธุ์ (Gaggia et al., 2010) กลุ่มของเชื้อแบคทีเรียเช่น จุลินทรีย์สายพันธุ์ *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. และ *Bifidobacterium* กลุ่มของยีสต์ เช่น *Saccharomyces* และกลุ่มของเชื้อราเช่น *Aspergillus*

คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นสารเสริมชีวนะ

Fuller (1989) ได้กล่าวถึง คุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะ ดังนี้

- เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการก่อประโยชน์แก่ตัวสัตว์ เช่นความสามารถในการเพิ่มสมรรถภาพการเจริญเติบโตหรือต้านทานเชื้อก่อโรค

- เป็นจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่าเป็นที่ยอมรับและมีความปลอดภัย (GRAS = Generally Recognized As Safe) ไม่ทำให้เกิดโรค ไม่เป็นพิษและต้องไม่เป็นเชื้อฉวยโอกาสก่อให้เกิดโรคเมื่อร่างกายของสัตว์อ่อนแอ (Lin et al., 2007)

- สามารถทนสภาวะความเป็นกรดของน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (Tsai et al., 2005) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้จุลินทรีย์สามารถดำรงชีวิตอยู่ภายในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ได้ ดังนั้นการคัดเลือกสารเสริมชีวนะในสัตว์ต่างๆ เช่น ไก่ ควรคำนึงถึงลักษณะทางกายภาพและ pH ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของไก่ตั้งแต่หลอดอาหารจนถึงลำไส้เล็กส่วนต้นอยู่ในสภาพเป็นกรด (3.17 – 6.4) ลำไส้เล็กส่วนปลายเกือบจะเป็นกลาง ส่วนลำไส้ใหญ่ตรงไส้ตันและทวารร่วม มี pH เป็นกรดถึงด่าง (5.40 – 8.40) โดยทั่วไปทางเดินอาหารของไก่ จะสั้นกว่ามนุษย์และสัตว์จำพวกสุกรและโค ระยะเวลาที่อาหารผ่านจึงสั้นกว่า คือประมาณ 2 ชั่วโมง 30 นาที (Parkhurst and Mountney, 1988) นอกจากนี้ Jin และคณะ (1998) รายงานว่าการทนกรดของแบคทีเรียในไก่อาจไม่สำคัญมากเท่ากับสัตว์อื่น ที่มีอัตราการผ่านของอาหารนานกว่า อย่างไรก็ตาม pH ของน้ำย่อยในทางเดินอาหารของไก่ สามารถลดลงต่ำถึง 0.5 – 2.0 ได้ จึงมีผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์สารเสริมชีวนะ ดังนั้นสารเสริมชีวนะที่ใช้สำหรับไก่ควรเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับ pH ของระบบทางเดินอาหารของไก่หรือใช้เทคนิคการเคลือบ เพื่อให้คงทนและแตกตัวในลำไส้เล็กส่วนปลายเพื่อหลีกเลี่ยงสภาวะที่อยู่ใน pH ระดับต่ำ

- มีความคงตัวสามารถออกฤทธิ์ได้แม้จะเก็บไว้เป็นระยะเวลานานและอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม

อนึ่งหากใช้สารเสริมชีวนะในระดับต่ำ (ต่ำกว่า $1x\ 10^5$ โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร ตามคำแนะนำของกรมปศุสัตว์) จะส่งผลให้ไม่สามารถทราบถึงประสิทธิภาพการเจริญเติบโตที่เกิดขึ้น

กลไกการทำงานของสารเสริมชีวนะ

- รักษาสภาวะสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร (Maxwell et al., 1983) โดยการแก่งแย่งโภชนะกันระหว่างจุลินทรีย์ที่เป็นสารเสริมชีวนะกับจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และกลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นสารเสริมชีวนะแย่งพื้นที่ในการจับตัวกับเยื่อบุลำไส้ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคมาเกาะและเพิ่มจำนวนไม่ได้ (Fuller, 1989) นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่เป็นสารเสริมชีวนะเหล่านี้ มีความสามารถในการต่อต้านการเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ใหม่บนผนังลำไส้โดยกระบวนการที่เรียกว่า Competitive Exclusion ซึ่งเป็นกลไกการต่อต้านการเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใหม่โดยจุลินทรีย์

เดิม ขณะเดียวกันจะส่งผลให้จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ เช่น *Lactobacillus* spp. เพิ่มจำนวนมากขึ้น จึงทำให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร

- จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์บางตัวมีการสร้างสารคล้ายยาต้านจุลชีพและสารอื่นๆซึ่งคอยควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้ (Ng et al., 2009) เช่นแบคเทอริโอซิน hydrogen peroxide และ organic acids บางชนิด ซึ่งแบคเทอริโอซินและ hydrogen peroxide ที่จุลินทรีย์กลุ่มแลคติกผลิตขึ้นนั้น จะออกฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์โดยตรงส่วน organic acids โดยเฉพาะกรดไขมันระเหยได้เช่นกรดแลคติกจะช่วยลด pH ของระบบทางเดินอาหาร จึงไม่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มจำนวนตัวของเชื้อจุลินทรีย์ใหม่

- กระตุ้นการสร้างและการทำงานของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร เช่น *Bacillus subtilis* สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ได้ทั้ง อะไมเลส และ โพรทีเอส (Giannenas et al., 2012) ทำให้อาหารในระบบทางเดินอาหารถูกย่อยได้เพิ่มมากขึ้น การใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะของสัตว์เพิ่มมากขึ้น (Roselli et al., 2005)

- มีการสร้างน้ำย่อยที่ร่างกายไม่สามารถสร้างได้เช่นกลุ่ม *Lactobacillus* spp. สามารถสร้างน้ำย่อย β -galactosidase ที่มีผลในการช่วยลดปริมาณน้ำตาล lactose ในอาหารซึ่งเป็นสาเหตุของการท้องเสียได้ (Macfarlane and Cummings, 1999)

- จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคในทางเดินอาหารให้สูงขึ้น (Ng et al., 2009) ป้องกันการติดเชื้อต่าง ๆ ซึ่งมักเข้าสู่ร่างกายตามระบบเยื่อบุ (mucosal immunity) โดยไปกระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ทำหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอม (macrophages) และเซลล์เพชฌฆาต (natural killers cells, NK cell) (Chiang et al., 2000) รวมทั้งมีส่วนในการควบคุมกระบวนการหลั่งสารป้องกันการอักเสบและการติดเชื้อในร่างกายสัตว์ (Roselli et al., 2005)

Bacillus strains

Bacillus spp. เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างของเซลล์เป็นรูปแท่งตรงเรียงตัวกันเป็นคู่ เส้นสาย วงกลมหรือ สี่เหลี่ยมติดสีแกรมบวกมี spore ที่สามารถทนความร้อน รังสี ความเป็นกรดด่างที่รุนแรงได้ดีเป็นพวกที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ ต้องการอินทรีย์สารเป็นอาหารสามารถเกิดกระบวนการหมักหรือกระบวนการหายใจทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เลวร้ายได้เช่นทนความร้อนและทนความเค็มได้ดี ทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส (Catalase Test) ให้ผลเป็นบวกแบคทีเรียในตระกูลนี้ สามารถพบได้หลายแหล่งบางสายพันธุ์อาจก่อให้เกิดโรคในสัตว์มีกระดูกสันหลังหรือสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Holt et al., 1994)

Bacillus subtilis

Snealth และคณะ (1986) รายงานว่า *Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก แบบที่ต้องการออกซิเจน (Aerobic Bacteria) หรือต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (Facultative Anaerobic Bacteria) พบได้โดยทั่วไป เช่น ในดิน น้ำจืด น้ำเค็ม เป็นต้น เชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเชื้อที่ไม่ทำให้เกิดโรค มีรูปร่างเป็นแท่งตรง เจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 5.5-8.5 อุณหภูมิระหว่าง 28-40 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญเติบโตได้แม้จะอยู่ในอุณหภูมิที่สูงถึง 55 องศาเซลเซียส (Breed et al., 1957) สามารถสร้าง Hydrolytic enzyme ที่สามารถแยกสลาย Polysaccharide, Nucleic acid และ Lipid ได้

Bacillus licheniformis

Breed และคณะ (1957) กล่าวว่า *Bacillus licheniformis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกแบบที่ต้องการออกซิเจน (Aerobic Bacteria) หรือต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (Facultative Anaerobic Bacteria) พบโดยทั่วไปในดินและอาหาร มีรูปร่างเป็นแท่งตรง ส่วนใหญ่ไม่มีโทษ เจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 5.5-8.5 อุณหภูมิระหว่าง 32 – 45 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญเติบโตได้อยู่ในช่วง 50-56 องศาเซลเซียส เป็นสิ่งมีชีวิตที่ย่อยสลายอินทรีย์สาร (Saprophyte) ในดิน เชื้อตัวนี้เหมาะสำหรับย่อยสลายสารอินทรีย์ ช่วยให้ไม่เน่าเหม็นและไม่เกิดแก๊สพิษขณะเน่าเปื่อย

บทบาทสำคัญของเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis*

1. ผลิตเอนไซม์โพรทีเอสออกมาย่อยโปรตีน

โพรทีเอส (protease) คือกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolase) ซึ่งสามารถย่อยสลายพันธะเพปไทด์ของสายโปรตีน รวมทั้งพันธะเอไมด์และเอสเทอร์ของกรดแอมิโน (Adler-Nissen, 1986) ซึ่งเอนไซม์โพรทีเอส สามารถแบ่งตามการเกิดไฮโดรไลซิสของพันธะเพปไทด์ได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

1.1 Endopeptidases คือกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเพปไทด์ซึ่งอยู่ภายในสายโมเลกุลของโปรตีนได้เป็นสายโซ่เพปไทด์สั้นๆ เอนไซม์กลุ่มเอนโดเปปติเดสจากพืชหรือจุลินทรีย์ มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงเนื่องจากมีความจำเพาะต่อซับสเตรท (Substrate) ที่เป็นเพปไทด์โมเลกุลใหญ่หลายชนิดและซับสเตรทที่เป็นโปรตีน ทำให้สามารถย่อยสลายโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว ยกตัวอย่างเช่น Serine endopeptidases, Cysteine endopeptidases, Aspartic endopeptidases และ Metallo endopeptidases

1.2 Exopeptidases คือกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเพปไทด์ด้านปลายโซ่ของโมเลกุล โดยเริ่มจากปลายด้านกลุ่มแอมิโน เรียก N-terminal หรือทางปลายด้านกลุ่มคาร์บอกซิล เรียก C-terminal ของสายโปรตีน เช่น Aminopeptidase, Carboxypeptidase และ Dipeptidase

เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มของ Serine endopeptidases ซึ่งมีกรดแอมิโนซีรีน (serine) อยู่ในตำแหน่งที่เป็นบริเวณเร่ง เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็นประเภท alkaline protease โดยมี pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง 7 ถึง 11 และจากรายงานก่อนหน้านี้ของ Wu และคณะ (2011) ที่ทำการทดลองลักษณะการเจริญเติบโต และความสามารถในการทนทานต่อสภาพแวดล้อมในลำไส้ของเชื้อ *Bacillus subtilis* KD1 ในหลอดทดลองพบว่า *Bacillus subtilis* KD1 สามารถผลิตเอนไซม์โพรทีเอสออกมาได้สูงมาก โดยสามารถผลิตได้สูงสุดถึง 1,369.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังสามารถทนทานต่อกรดในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดีได้ดีมากอีกด้วย

2. ผลิตสารแบคเทอริโอซิน

Dick (1993) รายงานว่า *Bacillus* spp. เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะแบคเทอริโอซินที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แบคเทอริโอซินเป็นเพปไทด์ที่สังเคราะห์โดยไรโบโซม โดยแบคเทอริโอซินที่อยู่ในสภาพพร้อมทำงาน (active form) ประกอบด้วยกรดแอมิโน 20-60 กรดแอมิโน ส่วนใหญ่จะมีประจุสุทธิเป็นบวกหรือเป็นกรดอย่างอ่อน ในสายเพปไทด์จะประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) ซึ่งมีคุณสมบัติที่คล้ายคลึงกับสารปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินมีความเฉพาะเจาะจงมากกว่าสารปฏิชีวนะ โดยมีฤทธิ์ในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญเติบโตเฉพาะแบคทีเรียที่อยู่ในสายพันธุ์เดียวกันหรือสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันเท่านั้น (Brink et al., 1994) แบคทีเรียที่มียีนแบคเทอริโอซินจะสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินเพื่อทำลายเซลล์ของแบคทีเรียที่ไม่มียีนภูมิคุ้มกันแบคเทอริโอซินได้ ในขณะเดียวกันจะไม่ทำลายเซลล์ของแบคทีเรียผู้ผลิตแบคเทอริโอซินเนื่องจากมีการสร้างภูมิคุ้มกัน ซึ่งแบคเทอริโอซินที่จุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Bacillus* spp. ผลิตได้นั้นเป็นกลุ่มของเพปไทด์ที่มีขนาดน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน โดยเรียกแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ว่าแลนติไบโอติก (lantibiotic) แบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้แรกเริ่มจะถูกสังเคราะห์ให้อยู่ในรูปของสายเพปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน (prepeptide) จึงจำเป็นต้องผ่านกระบวนการดัดแปลงสายเพปไทด์ในกระบวนการดัดแปลงหลังกระบวนการแปลรหัส เพื่อให้ได้สายเพปไทด์ที่พร้อมทำงาน สำหรับการออกฤทธิ์โดยทำให้เกิดช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (McAuliffe et al., 2001)

3. ผลิตกรดแลคติก

กรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ อยู่ในรูปของโมเลกุลไม่แตกตัวทำให้สามารถแพร่เข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้ไซโตพลาสซึมภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ มีสภาวะเป็นกรดสูง ส่งผลให้แรงขับเคลื่อนโพรตอน (electrochemical proton gradient) เพื่อนำ H^+ ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ออกนอกเซลล์เสียไป ทำให้ระบบขนส่งผิดปกติ เซลล์จึงถูกทำลาย (Ammor et al., 2006) กรดแลคติกยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ แต่แบคทีเรียแกรมลบจะมีความไวต่อกรดมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Maragkoudakis et al., 2006) โดย Asahara และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาในหนู mice ที่ได้รับเชื้อ *E. coli* พบว่าการได้รับสารเสริมชีวนะสายพันธุ์ *Bacillus* spp. สามารถเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดในหนู mice ได้โดยที่ *Bacillus* spp. จะผลิตกรดแลคติกซึ่งส่งผลให้ค่า pH ในลำไส้เล็กของหนู mice ต่ำลง ส่งผลให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli* ได้

การใช้สารเสริมชีวนะในสัตว์ปีก

การใช้สารเสริมชีวนะเป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์ เริ่มมีมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1965 โดยมีการนำสารเสริมชีวนะมาผสมกับอาหาร เพื่อปรับปรุงสุขภาพของสัตว์และช่วยต้านทานเชื้อก่อโรค ซึ่งในขณะนั้นมีการสันนิษฐานว่าสารเสริมชีวนะมีผลต่อการรักษาอาการท้องร่วงและลดจุลินทรีย์ก่อโรคที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารได้ซึ่งสาเหตุที่มีการนำสารเสริมชีวนะมาใช้นั้นเนื่องจาก ในอดีตมีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อกระตุ้นสมรรถภาพการเจริญเติบโตของไก่ยับยั้งการเกิดโรค ซึ่งอาหารไก่ทั่วๆไปจะมีการผสมยาปฏิชีวนะ 4-10 กรัมต่อตันและมีการใช้ยาปฏิชีวนะมากกว่า 1 อย่างขึ้นไปเพื่อเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่อง อาจทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคเกิดการดื้อยา รวมทั้งมีการตกค้างของยาในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้ ซึ่งส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคโดยตรง นอกจากนี้ยังมีผลทำลายเชื้อจุลินทรีย์ ที่เป็นเชื้อเจ้าถิ่นที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารได้ (Capurso, 2001) นอกจากนี้มีการทดลองเลี้ยงไก่แบบไม่ให้ยาปฏิชีวนะในอาหารพบว่า ลูกไก่มีอัตราการเจริญเติบโตช้าและมีประสิทธิภาพในการใช้อาหารน้อยลง (Ahmad, 2006) ดังนั้นจึงมีการนำสารเสริมชีวนะไปใช้ในการเลี้ยงไก่ เพื่อเพิ่มสมรรถภาพการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้สารอาหาร ซึ่งทำให้ไก่มีการนำสารอาหารที่ได้รับไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น ซึ่งประสิทธิภาพและกิจกรรมของสารเสริมชีวนะมีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ (Pascual et al., 1999) โดยจุลินทรีย์เหล่านี้ต้องได้รับการคัดเลือกมาอย่างดีแล้วว่ามีลักษณะการทำงานที่เหมาะสมต่อการเป็นสารเสริมชีวนะ มีความคงตัวต่อสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่ ไม่ถูกย่อยหรือทำลายได้ง่ายและไม่เป็นพิษต่อไก่ สำหรับการศึกษาการเสริมสารเสริมชีวนะมีหลายรูปแบบด้วยกันตัวอย่างงานวิจัยได้แก่

Opanlinski และคณะ (2007) ทำการทดลองโดยใช้ไก่เนื้อเพศผู้ พันธุ์ Ross จำนวน 1,200 ตัวโดยทำการทดลองที่อายุ 1-42 วัน รายงานว่าการเสริม *Bacillus subtilis* ในอาหารไก่เนื้อที่ระดับ $8X10^5$ และ $3X10^5$ โคโลนีต่อกรัม (CFU/g) อาหาร ไม่ส่งผลให้น้ำหนักตัวในช่วง วันที่ 21, 35และ 42 มีความแตกต่างกัน แต่พบว่าปริมาณการกินอาหารเพิ่มสูงขึ้น ($P<0.05$) และกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม *Bacillus subtilis* มีประสิทธิภาพการใช้อาหารดีขึ้น ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Sen และคณะ (2012) รายงานว่าการเสริม *Bacillus subtilis* LS 1-2 ในอาหารไก่เนื้อพันธุ์ Ross จำนวน 320 ตัวที่ระดับ $1X10^7$, $1X10^8$ และ $1X10^9$ โคโลนีต่อกิโลกรัม อาหาร มีผลทำให้สมรรถภาพการเจริญเติบโต การย่อยได้ที่ปรากฏเพิ่มขึ้นแบบ linear ($P<0.05$) เมื่อระดับของ *Bacillus subtilis* LS 1-2 เพิ่มขึ้น และวันที่ 35 ของการทดลอง ไก่เนื้อที่ได้รับ *Bacillus subtilis* LS 1-2 มีจำนวนเชื้อ *Clostridium* และ Coliform ในไส้ตันลดลง (linear, $P < 0.05$) นอกจากนี้ยังทำให้ความสูงของวิลไลและสัดส่วนของวิลไลต่อคริปท์ในส่วนของลำไส้เล็กส่วนต้น และลำไส้เล็กส่วนปลายเพิ่มขึ้นอีกด้วย (linear, $P <0.05$)

Lee และคณะ (2010) รายงานว่าการเสริม *Bacillus subtilis* ที่ระดับ $1.5 X 10^5$ โคโลนีต่อกรัม (CFU/g) อาหาร ในอาหารไก่เนื้อที่อายุ 1-21 วันพบว่า ความสูงของวิลไลในลำไส้เล็กส่วนปลายเพิ่มสูงขึ้นจาก 760 เป็น 1011 μm และความลึกของคริปท์ลดลงจาก 240 เป็น 169 μm เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$)

Molna´r และคณะ (2011) รายงานว่าการเสริม *Bacillus subtilis* ในรูปแบบผงปริมาณ 500 กรัมต่อตันอาหาร ในอาหารไก่เนื้อที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับคือ 7.27×10^8, 7.27×10^9, 7.27×10^{10} และ 7.27×10^{11} โคโลนีต่อกรัม (CFU/g) อาหารตามลำดับ ทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นและประสิทธิภาพการใช้อาหารดีขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังทำให้มีการลดลงของประชากร *E. coli* ในลำไส้เล็กส่วนปลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P <0.05$)

Wu และคณะ (2011) ทำการทดลองโดยการเสริม *Bacillus subtilis* KD1 ในอาหารไก่เนื้อโดยใช้ไก่จำนวน 50 ตัว เสริมในรูปแบบผงปริมาณ 100 กรัมต่อตันอาหาร ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับคือ 1×10^9, 5×10^9 และ 1×10^{10} โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหารตามลำดับ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันของกลุ่มที่ได้รับการเสริม *Bacillus subtilis* KD1 ที่ระดับ 10^{10} โคโลนีต่อกิโลกรัมดีขึ้น ($P <0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และสามารถเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์

ในลำไส้ได้ โดยการเพิ่มประชากรของเชื้อ *Lactobacillus* และลดประชากรของเชื้อ *E. coli* ($P < 0.05$) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Xiaolu และคณะ (2012) ทำการทดลองในไก่เนื้อจำนวน 900 ตัว เพื่อศึกษาผลของการเสริม *Bacillus licheniformis* ที่ระดับ 5.6×10^9 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) ในน้ำดื่มพบว่า กลุ่มที่ได้รับการเสริม *Bacillus licheniformis* มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และมีประสิทธิภาพการใช้อาหารดีขึ้น ($P<0.05$) ในสัปดาห์ที่ 3-6 และ 0-6 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากหลายงานวิจัยสามารถสรุปได้ว่า การใช้สารเสริมชีวนะช่วยปรับสภาพภายในลำไส้ของสัตว์ให้ดีขึ้น ทำให้ลำไส้มีความเป็นกรดเพิ่มมากขึ้น โดยการผลิตกรดอินทรีย์และยังมีการหลั่งสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคต่าง ๆ รวมทั้งช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้สัตว์มีสุขภาพดีส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตของสัตว์เพิ่มมากขึ้นเทียบเท่ากับการใช้ยาปฏิชีวนะ (Toghyani and Tabeidian, 2011) และลดอัตราการตายของสัตว์ภายในฟาร์ม (Lodemann et al., 2006)

แต่ทั้งนี้การใช้สารเสริมชีวนะอาจไม่ให้ผลดีอย่างสม่ำเสมอทุกครั้งไป เนื่องจากการใช้สารเสริมชีวนะให้มีประสิทธิภาพนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่อไปนี้ (Fuller, 1989)

1. สายพันธุ์ของเชื้อสารเสริมชีวนะควรเป็นสายพันธุ์ที่มีความทนต่อสภาพในทางเดินอาหาร ไม่ถูกย่อยหรือถูกทำลายโดยง่าย
2. ปริมาณที่ใช้ ควรใช้ตามคำแนะนำจากทางผู้ผลิตเนื่องจากสารเสริมชีวนะแต่ละชนิด ต่างมีปริมาณการใช้ที่เหมาะสมแตกต่างกันไป
3. สภาพการเก็บรักษา ควรเก็บไว้ในที่แห้งและเย็น เพื่อคงสภาพของสารเสริมชีวนะไว้จนกว่าจะใช้งาน
4. ลักษณะของอาหารและการให้สารเสริมชีวนะร่วมกับการใช้ยาซึ่งการใช้ยาเพื่อกำจัดจุลชีพหรือน้ำที่มีส่วนผสมของคลอรีนร่วมกับการใช้สารเสริมชีวนะ จะส่งผลให้สารเสริมชีวนะที่เสริมตายด้วย ทำให้ไม่ได้ผลตามที่ต้องการและยังทำให้ต้นทุนการผลิตสูงเกินกว่าความจำเป็น
5. อายุและสุขภาพของสัตว์ โดยพบว่าการใช้สารเสริมชีวนะในช่วงที่สัตว์กำลังหย่านมหรือมีอายุน้อยและสัตว์ที่มีสุขภาพดีจะให้ผลตอบสนองได้ดีกว่าสัตว์ที่มีอายุมากและสัตว์ที่กำลังป่วย

อย่างไรก็ตามข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารเสริมชีวนะกลุ่ม *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* ในไก่เนื้อในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก ด้วยเหตุนี้จึงเกิดความสนใจที่จะนำจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังกล่าวไปทดลองใช้ในไก่เนื้อเพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อในประเทศไทยได้

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองครั้งนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Approval No. 1431002)

3.1 สัตว์ทดลองและการจัดการ

ไก่เนื้อเพศเมียพันธุ์ Ross 308 อายุ 1 วันจำนวน 288 ตัว โดยทำการเลี้ยงรวมกันที่ความหนาแน่น 12 ตัวต่อตารางเมตรเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ ในโรงเรือนเปิด ทำการสุ่มแบ่งลูกไก่ออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 6 ซ้ำๆ ละ 12 ตัว แต่ละกลุ่มทดลองจะมีน้ำหนักเฉลี่ยที่ไม่แตกต่างกัน ไก่ทุกตัวได้รับอาหารแบบกินเต็มที่ (*ad libitum*) และมีน้ำดื่มอย่างเพียงพอตลอดระยะเวลาการทดลองไก่ทุกตัวได้รับวัคซีนนิวคาสเซิล (Newcastle disease, ND) และวัคซีนหลอดลมอักเสบติดต่อ (Infections bronchitis, IB) จากโรงฟัก

3.2 อาหารทดลอง

อาหารทดลองมี 4 สูตรดังแสดงในตารางที่ 2 ประกอบด้วย 1) อาหารกลุ่มควบคุม 2) อาหารควบคุมเสริมด้วยยาปฏิชีวนะ Amoxycillin 200 พีพีเอ็ม (ppm) 3) อาหารควบคุมเสริมด้วย *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* 2.5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหารและ 4) อาหารควบคุมเสริมด้วย *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* 5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร ตามลำดับ อาหารทุกสูตรมีค่าพลังงานและโปรตีนไม่น้อยกว่าความต้องการของไก่เนื้อพันธุ์ Ross 308 (Aviagen, 2012) ส่วนประกอบของอาหารทดลองแสดงในตารางที่ 3 นอกจากนี้ทำการสุ่มตัวอย่างอาหารทดลองทุกสูตร โดยสุ่มจำนวน 1 จุด (100 ก.) ต่อถุง รวม 12 ถุง นำมารวมกันให้ได้จำนวน 1,200 กรัม เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

ตารางที่ 2 อาหารทดลอง

กลุ่มทดลอง	อาหารทดลอง
1	อาหารกลุ่มควบคุม
2	อาหารควบคุมเสริมยาปฏิชีวนะ Amoxycillin 200 พีพีเอ็ม (ppm)
3	อาหารควบคุมเสริม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* 2.5×10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร
4	อาหารควบคุมเสริม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* 5×10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของอาหารทดลอง (g/kg)

วัตถุดิบ	Starter	Grower	Finisher
ข้าวโพด	436.4	459	489.7
มันสำปะหลัง	60	80	100
ถั่วเหลืองไขมันเต็ม	85	80	75
กากถั่วเหลือง	320	281.3	240
หินเกลือ 50%	5.4	5.6	5.5
หินปูน	13.1	12	11.1
โมโนไดแคลเซียม	14.8	14.4	13.3
น้ำมันรำข้าว	48.5	51.8	53.6
ดีแอลเมทไธโอนีน	2.6	2.4	2.4
แอลไลซีน	0.3	0	0
โคลีน คลอไรด์75%	1.9	1.5	1.4
สารดูดซับสารพิษ	2	2	1
พรีมิกซ์	8	8	5
โซเดียมไบคาร์บอเนต	1	1	1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.3 สารเสริมชีวนะสำหรับการทดลอง

สารเสริมชีวนะที่ใช้ในการทดลองผลิตโดยบริษัท เค เอ็ม พี ไบโอเทค จำกัดจังหวัดชลบุรี ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ชีวภาพในรูปแบบผง ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* ที่คัดเลือกสายพันธุ์แล้วมีความเข้มข้นอยู่ที่ 10^{10} โคโลนีต่อกิโลกรัมของผลิตภัณฑ์ โดยมีการเสริมลงไปในรูปแบบ การป้อนเชื้อโดยตรง (direct fed microbials) คือการให้สารเสริมชีวนะควบคู่ไปกับอาหารของไก่เนื้อตามปกติ

3.4 การเก็บข้อมูล

3.4.1. อุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์

บันทึกอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์ในโรงเรือน เวลา 8.00 และ 16.00 น. ทุกวัน พบว่าช่วงทดลองอุณหภูมิมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 30.0 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 72%

3.4.2. สมรรถภาพการเจริญเติบโต

บันทึกน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่กินในแต่ละกลุ่มในวันเริ่มต้น วันที่ 21 ของการทดลองและสิ้นสุดการทดลอง (42 วัน) โดยมีการบันทึกจำนวนไก่ตายทุกวัน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้คำนวณหาปริมาณอาหารที่กินต่อตัวต่อวัน น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นและประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว

ในระหว่างวันที่ 18-20 และ 39-41 ของอายุไก่ทดลอง ทำการผสมสารบ่งชี้การย่อยได้ acid insoluble ash (AIA) ปริมาณร้อยละ 2 ในอาหาร ให้ไก่กินต่อเนื่องเป็นเวลา 3 วัน ในวันที่ 21 และ 42 ของอายุไก่ทำการสุ่มไก่ ซ้ำละ 2 ตัว เพื่อการุณยฆาตโดยการฉีด sodium pentobarbital เกินขนาด (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 22G ขนาด 1.5 นิ้ว เข้าที่หัวใจ (intracardiac injection) จากนั้นเปิดซากเพื่อทำการเก็บตัวอย่าง

3.4.3 การย่อยได้ปรากฏของลำไส้เล็กส่วนปลาย

เก็บตัวอย่างอาหารในส่วนลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileal content) ตั้งแต่บริเวณ Meckel's diverticulum ถึง Ileocecal junction โดยวิธีการรูดเบาๆจากนั้นนำตัวอย่างที่ได้จากไก่ 2 ตัวในแต่ละซ้ำในปริมาณที่เท่ากันมารวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 6 ตัวอย่างต่อกลุ่ม เก็บใส่กล่องพลาสติกแล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์ปริมาณโภชนะตามวิธีการของ AOAC (1990) และวิเคราะห์ AIA ทั้งในอาหารและอาหารในลำไส้เล็กส่วนปลาย ตามวิธีการของ Angkanaporn และคณะ (1996)

3.4.4.จำนวนของเชื้อแบคทีเรีย

ในวันที่ 21 และ 42 ของการทดลองจะมีการเก็บตัวอย่างลำไส้ส่วนไส้ตัน เพื่อนำมาตรวจหาจำนวนของเชื้อแบคทีเรียโดยทำการเก็บตัวอย่างใส่ในถุงพลาสติกที่เตรียมไว้แล้วนำไปแช่ในถังน้ำแข็งทันทีจากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp. (Inhouse method, 2005) Lactic acid bacteria (ISO, 1998) *E. coli* (ISO, 2005) และ *Salmonella* spp. (ISO, 2002)

3.4.5.การหาค่าสัณฐานวิทยาในลำไส้

ในวันที่ 21 และ 42 ของการทดลองจะมีการเก็บตัวอย่างของลำไส้เล็กส่วนกลาง บริเวณจุดกึ่งกลางระหว่าง Bile duct entry กับ Meckel ‘s diverticulum ความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร จากนั้นนำมาแช่ใน 10 % buffered formalin เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าสัณฐานวิทยาในลำไส้ทางห้องปฏิบัติการตามวิธีของ Tsirtsikos และคณะ (2012)

3.4.6 การวัดค่า pH ของของเหลวในลำไส้

วัดค่า pH ของของเหลวในลำไส้โดยใช้ pH Meter ตามวิธีของ Veerle และคณะ (2004)โดยวัดค่า pH ของของเหลวในลำไส้บริเวณเหนือกึ่งกลางของลำไส้เล็กส่วนกลาง ในวันที่ 21 และ 42 ของการทดลอง

3.5 การวิเคราะห์ทางเคมี

3.5.1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนะของอาหาร

นำอาหารทดลองทุกสูตรที่สุ่มเก็บไว้ไปวิเคราะห์หาคุณค่าทางโภชนะโดยประมาณ (proximate analysis) ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า แคลเซียม และฟอสฟอรัส ตามวิธีการของ AOAC (1990) ดังแสดงในตารางที่ 5

3.5.2. การวิเคราะห์หาเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash)

ชั่ง ileal content ที่ผ่านการอบจนแห้งจำนวน 1 กรัม และอาหารทดลองจำนวน 2 กรัมใส่ในถ้วยเผา (crucible) (Pyrex®, England) แยกกันตัวอย่างละถ้วย จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นลงในโถดูดความชื้น (dessicator) จดบันทึกน้ำหนักหลังอบเพื่อคำนวณหาร้อยละของความชื้นในตัวอย่าง แล้วนำไปเผาต่อที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นลงในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาร้อยละของเถ้า จากนั้น นำถ้วยเผาที่มีเถ้าของอาหารทดลอง และ ileal content ไปต้มในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 4 N เป็นเวลา 30 นาที บนเตาให้ความร้อน (hot plate) โดยทำภายในตู้ดูดควันเมื่อครบเวลา

แล้ว นำถ้วยเผาที่มีเถ้ามาล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นโดย suction pump แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำไปเผาและต้มอีกครั้งเพื่อให้แน่ใจว่าสิ่งที่เหลืออยู่คือเถ้าที่ไม่ละลายในกรด สุดท้ายนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นลงในโถดูดความชื้นแล้วนำไปชั่งน้ำหนักถ้วยเผาจนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาร้อยละของเถ้าที่ไม่ละลายในกรด acid insoluble ash AIA (%) ตามสมการ

$$AIA\ (\%) = \frac{Wf - We}{Ws} \times 100$$

Wf = น้ำหนักถ้วยเผาและเถ้าที่ไม่ละลายในกรด

We = น้ำหนักถ้วยเผา

Ws = น้ำหนักตัวอย่าง

คำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนะไขมันและโปรตีนปรากฏที่ลำไส้เล็กส่วนปลาย (apparent nutrient ileal digestibility; ID) ดังสมการ

$$ID = 1- \frac{(\text{อัตราส่วนโภชนะ/AIA})_{\text{ileal content}}}{(\text{อัตราส่วนโภชนะ/AIA})_{\text{diet}}}$$

3.6 การวิเคราะห์หาจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย

3.6.1. การวิเคราะห์หาจำนวนของเชื้อ *Bacillus* spp.

วิธีการทดสอบ

เตรียมตัวอย่างสารตั้งต้นโดยการละลายตัวอย่างกับ Peptone salt solution (PSS) ในอัตราส่วน 1 : 9 (ตัวอย่าง :PSS) จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหาร MYP agar จำนวน 2 จานเพาะเชื้อ ทำทั้งหมด 3 ระดับการเจือจางที่ต่อเนื่องกัน ใช้ spreader เกลี่ยส่วนผสมให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 หรือ 42-48 ชั่วโมง จากนั้นนำมานับจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อที่มีจุลินทรีย์ $\geq$ 15 โคโลนี โดยนับ 2 ระดับการเจือจางที่ต่อเนื่องกัน

เลือกโคโลนีเพื่อทำการยืนยันการทดสอบผล 5โคโลนี โดยใช้ loop เขี่ยแล้ว streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP agar และ Blood agar บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

อ่านผลการทดสอบ MYP agar = โคโลนีสีเหลือง
Blood agar = ไม่เกิด heamolysis
Gram's stain = large gram positive bacilli

รายงานผลการทดสอบ *Bacillus* spp. ต่อ 1กรัม
จากนั้นนำไปยืนยันผลอีกครั้งใน Nitrate broth และ Ammonium salt sugar ว่าเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis*
โดยใน Nitrate broth ผล + = สีแดง ใน Ammonium salt sugar ผล + = สีเหลือง
ผล – = สีเหลือง ผล – = สีม่วง

รายงานผลการทดสอบ *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* group ต่อ 1กรัม

การคำนวณผลการทดสอบ
ใช้สูตรดังนี้

$$\frac{\text{จำนวนโคโลนีที่ผ่านการยืนยันผล}}{\text{จำนวนโคโลนีที่นำมายืนยันผล}} \times \frac{\text{จำนวนโคโลนีทั้งหมดที่นับได้จากจานเพาะเชื้อ}}{\text{ปริมาณที่ทำการทดสอบ} \times \text{ระดับการเจือจาง}}$$

การรายงานผลการทดสอบ

รายงานผลเป็นจำนวน *Bacillus* spp. ต่อ 1 กรัม โดยแสดงจำนวนระหว่าง 1.0 – 9.9 คูณด้วย 10^{x} เมื่อ x เป็นค่ากำลังของ 10 โดยการรายงานผลการทดสอบควรระบุถึงอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเพาะเชื้อหรือรายงานเกี่ยวกับรายละเอียดของปัจจัยที่มีผลกระทบต่อผลการทดสอบด้วยซึ่งในกรณีที่ผลการทดสอบน้อยกว่า 10^{4} โคโลนีต่อกรัม (CFU/g) ให้รายงานผลว่า presumptive *Bacillus* spp. ส่วนการยืนยันผลการทดสอบว่าเชื้อที่ได้เป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่มของ *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* นั้น หากผลการทดสอบให้ผลไม่ตรงกับในตาราง Biochemical test ให้รายงานผลว่า *Bacillus* spp. ในขณะที่หากผลการทดสอบตรงกับตาราง Biochemical test ให้รายงานผลว่า *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* group

3.6.2. การวิเคราะห์หาจำนวนของเชื้อ lactic acid bacteria

วิธีการทดสอบ

เตรียมตัวอย่างสารตั้งต้นโดยการละลายตัวอย่างกับ Peptone salt solution (PSS) ในอัตราส่วน 1 : 9 (ตัวอย่าง :PSS) จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อ ทำ

ทั้งหมด 3 ระดับการเจือจางที่ต่อเนื่องกัน จากนั้นเท MRS agar ที่เตรียมไว้ประมาณ 15 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่าง ทำการผสมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าด้วยกันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 $\pm$ 3 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนี 15 – 300 โคโลนี จากสองระดับการเจือจางที่ต่อเนื่องกันและนำไปคำนวณหาจำนวน lactic acid bacteria ต่อ 1กรัม

การคำนวณผลการทดสอบ

คัดเลือกจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 300 โคโลนี ทั้ง 2 จานเพาะเชื้อ นับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นทั้ง 2 จานที่มาจากการเจือจางเดียวกัน โดยนับ 2 ระดับการเจือจางที่ต่อเนื่องกัน ใช้สูตรดังนี้

$$N = \frac{\sum c}{V \times (n_1 + 0.1 n_2) d}$$

N = จำนวนจุลินทรีย์ที่มีหน่วยเป็น โคโลนีต่อกรัม (CFU/g)

$\sum C$ = ผลรวมของจำนวนโคโลนีที่เจริญในจานเพาะเชื้อจาก 2 การเจือจางที่ต่อเนื่องกัน

V = ปริมาตรเป็นมิลลิลิตรของสารละลายตัวอย่างที่ใส่ในแต่ละจานเพาะเชื้อ

n_1 = จำนวนจานเพาะเชื้อของระดับการเจือจางแรก

n_2 = จำนวนจานเพาะเชื้อของระดับการเจือจางที่สอง

d = dilution factor ของระดับการเจือจางแรก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การรายงานผลการทดสอบ

รายงานผลเป็นจำนวน lactic acid bacteria ต่อ 1กรัม โดยแสดงจำนวนระหว่าง 1.0 – 9.9 คูณด้วย 10^x เมื่อ x เป็นค่ากำลังของ 10 โดยที่การรายงานผลควรระบุถึงอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเพาะเชื้อ หรือรายงานเกี่ยวกับรายละเอียดของปัจจัยที่มีผลกระทบต่อผลการทดสอบด้วย

3.6.3. การวิเคราะห์หาจำนวนของเชื้อ *E. coli*

วิธีการทดสอบ

เตรียมเจือจางตัวอย่างตั้งต้นและเจือจางสารละลายตัวอย่าง จากนั้นแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก ปิเปตสารละลายเจือจางตัวอย่างตั้งต้น 10 มิลลิลิตร ลง double – lauryl sulfate tryptosebroth ทั้งหมด 3หลอด ส่วนกลุ่มที่สอง ปิเปตสารละลายเจือจางตัวอย่าง 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} จำนวน 1มิลลิลิตร ลง single – lauryl sulfate tryptose broth ที่ระดับละ 3 หลอด รวม

4 ระดับการเจือจาง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24± 2 ชั่วโมง ในกรณีอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น เกิดก๊าซน้อยหรือไม่เกิดก๊าซให้เพาะเลี้ยงต่อที่ 48± 2 ชั่วโมง นำหลอดที่เกิดก๊าซถ่ายลงในอาหาร EC broth เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 44± 1 องศาเซลเซียสใน water bath เป็นเวลา 24± 2 ชั่วโมง ในกรณีอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น เกิดก๊าซน้อยหรือไม่เกิดก๊าซให้เพาะเลี้ยงต่อที่ 48± 2 ชั่วโมง นำหลอดที่เกิดก๊าซถ่ายลงในอาหาร tryptone water เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 44 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48±2 ชั่วโมงเมื่อครบตามเวลาที่กำหนดแล้วนำไปทดสอบด้วย Indole reagent หากสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดงผลจะเป็น positive รายงานผลทดสอบเป็น MPN *E. coli* ต่อ 1 กรัม

การคำนวณผลการทดสอบ

นำค่าที่ได้จากการทดสอบ คำนวณค่า MPN จากตาราง MPN ซึ่งการเจือจางสูงสุดคือการเจือจางที่มีความเข้มข้นของตัวอย่างน้อยที่สุดโดยมีหลักการเลือกดังแสดงในตารางที่ 4

กรณีที่1 หากมีอย่างน้อยที่สุดมี 1 ระดับการเจือจางให้ผลบวกทั้ง 3 หลอด ให้เลือกระดับการเจือจางสูงสุดที่ให้ผลบวกทั้ง 3 หลอด และเลือกระดับการเจือจางที่สูงขึ้นมาอีก 2 ระดับ นำไปคำนวณหาค่า MPN จากตาราง MPN ดังตัวอย่างที่ 1

กรณีที่2 เลือกการเจือจางสูงสุดซึ่งไม่มีหลอดที่ให้ผลบวก และเลือกการเจือจางที่ต่ำกว่าอีก 2 อันดับ นำไปคำนวณค่า MPN ดังตัวอย่างที่ 2

กรณีที่3 หากไม่มีไม่มีระดับการเจือจางที่ให้ผลบวกทั้ง 3 หลอด ให้เลือก 3 ระดับการเจือจางที่สูงสุด โดยการเจือจางที่ระดับตรงกลางต้องมีอย่างน้อยที่สุดให้ผลบวก 1 หลอด นำจำนวนที่ให้ผลบวกทั้ง 3 ระดับการเจือจาง คำนวณหาค่า MPN จากตาราง MPN ดังตัวอย่างที่ 3

กรณีที่4 และ 5 หากมีอย่างน้อย 1 ระดับการเจือจางใน 3 ระดับการเจือจางแรกซึ่งไม่มีหลอดที่ให้ผลบวก ให้เลือกระดับการเจือจางที่ต่ำสุดที่ไม่ให้ผลบวกและการเจือจางที่ต่ำลงไปอีกสองระดับตามลำดับคือ เจือจาง 10 และ 100 เท่าของการเจือจางระดับแรก ตัวอย่างที่ 4 และ 5 ยกเว้นเมื่อพบหลอดที่ให้ผลบวกเพียงการเจือจางระดับแรกของตัวอย่างจึงจำเป็นต้องเลือกการเจือจางสามระดับแรกเพื่อคำนวณหาค่า MPN ถึงแม้ว่าอีกสองระดับการเจือจางไม่มีหลอดที่ให้ผลบวก

ตารางที่ 4 ตัวอย่างการเลือกจำนวนหลอดที่แสดงค่า positive เพื่อนำไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN

ตัวอย่าง	จำนวนหลอดที่แสดงค่า positive จากจำนวน 3 หลอดในแต่ละการเจือจางของตัวอย่าง					MPN/ml/g	
	ตัวอย่างน้ำ10 ml	1 ml	10^{-1} ml	10^{-2} ml	10^{-3} ml		
	ตัวอย่างผง 1 g	10^{-1} g	10^{-2} g	10^{-3} g	10^{-4} g	ตัวอย่างน้ำ	ตัวอย่างผง
1	3	3	2	1	0	1.5×10^{1}	1.5×10^{2}
2	3	3	3	0	0	2.4×10^{1}	2.4×10^{2}
3	2	2	1	1	0	7.4	7.4×10^{1}
4	3	3	0	0	0	2.4	2.4×10^{1}
5	2	2	0	1	0	2.1×10^{-1}	2.1

การคำนวณจากตาราง MPN

นำจำนวนตัวเลขที่เลือกไว้จากการเจือจาง 3 อันดับ ที่ต่อเนื่องกันไปเปรียบเทียบกับตาราง MPN โดยค่าที่ได้จากตาราง MPN นำมาคูณด้วยสัดส่วนกลับของระดับการเจือจางที่ต่ำสุด (ค่าความเข้มข้นของตัวอย่างสูงสุด)

การรายงานผลการทดสอบ

รายงานผลเป็นจำนวน *E. coli* ต่อ 1 กรัมโดยแสดงจำนวนระหว่าง 1.0 – 9.9 คูณด้วย 10^{x} เมื่อ x เป็นค่ากำลังของ 10

3.6.4. การวิเคราะห์หาจำนวนของเชื้อ *Salmonella* spp.

วิธีการทดสอบ

เริ่มจากการเตรียมตัวอย่างทดสอบ (Pre-enrichment) 25 กรัม ใส่ลงใน Buffered peptone water (BPW) ปริมาตร 225 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา18 $\pm$ 2 ชั่วโมง ซึ่งขั้นตอน pre-enrichment นี้มีเพื่อทำให้เซลล์ของ *salmonella* spp. ที่บาดเจ็บฟื้นคืนสภาพเป็นเซลล์ที่แข็งแรง เจริญและเพิ่มจำนวนจนถึงระดับที่ตรวจพบได้ ในขั้นนี้จะต้องเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญ (nonselective

broth) จากนั้นเมื่อครบเวลาที่กำหนด นำตัวอย่างออกมาจากตู้อบและถ่ายลงอาหารเหลว selective enrichment โดยทำทั้งหมด 2 แบบด้วยกันคือ

แบบที่หนึ่ง ปิเปตเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร ลงใน RVS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 41.5$\pm$ 1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 $\pm$ 3 ชั่วโมง

แบบที่สอง ปิเปตเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงใน KMTTn broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37$\pm$ 1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24$\pm$ 3 ชั่วโมง

จากนั้นนำตัวอย่างมาทดสอบเพื่อคัดเลือกเชื้อต่อ โดยใช้ sterile loops จุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (RVS broth และ KMTTn broth) และ streak เชื้อลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (selective solid media) 2 ชนิดคือ XLD agar และ BGA agar นำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37$\pm$ 1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24$\pm$ 3 ชั่วโมง

ยืนยันลักษณะโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *salmonella* spp. จาก XLD agar และ BGA agar ถ้าให้ผลบวกเลือกมา 1 โคโลนี ถ้าโคโลนีแรกให้ผลลบ ให้เลือกเพิ่มอีก 4 โคโลนี และนำโคโลนีที่ได้มา streak บน nutrient agar และบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37$\pm$ 1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา24 $\pm$ 3 ชั่วโมงขั้นตอนต่อไปจึงทำการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (biochemical test) เพื่อยืนยันผลโดยใช้ TSI agar, urea agar, L-Lysine decaboxylation medium, b-Galactosidaes reagent, VP-reaction, Indole reaction และนำไปทดสอบยืนยันทางซีรัมวิทยา (serological confirmation) โดยการ ทดสอบการตกตะกอนได้แก่การทดสอบ O-antigen, Vi-antigen และ H-antigen

การรายงานผลการทดสอบ

รายงานผลการทดสอบว่าพบเชื้อหรือไม่พบเชื้อ *salmonella* spp. ในตัวอย่าง 25 กรัม ที่ทำการทดสอบ

3.7 การวิเคราะห์หาค่าสัณฐานวิทยาในลำไส้

ทำการศึกษาลำไส้เล็กในส่วนกลาง เนื่องจากเป็นส่วนของลำไส้ไก่ที่มีการดูดซึมอาหารมากที่สุด โดยการตัดชิ้นเนื้อหนา 6 ไมโครเมตร (จำนวน 4 ชิ้นต่อลำไส้) ด้วยเครื่อง Microtome จากนั้นวางชิ้นเนื้อที่ตัดแล้วบนแผ่นสไลด์ ย้อมด้วยสี Hematoxylin & Eosin ตามวิธีของ Tsirtsikos และคณะ (2012) เมื่อย้อมเสร็จให้นำแผ่น coverslip มาปิดทับเนื้อเยื่อที่ย้อมไว้บนแผ่นสไลด์แล้วทิ้งไว้ประมาณ 2 วันก่อนที่จะนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากหากนำไปส่องทันทีสีที่ย้อมอาจจะยังไม่แห้งทำให้แผ่น coverslip เลื่อนได้ ซึ่งจะส่งผลให้เนื้อเยื่อที่ย้อมไว้เสียหาย

เมื่อครบกำหนด 2 วัน ทำการถ่ายภาพตัวอย่างชิ้นเนื้อจำนวนทั้งหมด 4 ภาพโดยใช้กล้องดิจิตอล Micropublisher 5.0 (Qimage, Surrey, BC, Canada) ที่เชื่อมต่อกับกล้องจุลทรรศน์ชนิด

แสงสว่าง (Olympus, Tokyo, Japan) นำภาพที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าความสูงของวิลไลและความลึกของคริปท์ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Image-PRO®PLUS 6.0 (Media Cybernatics, Inc, Bethesda,MD, USA) ซึ่งในแต่ละภาพทำการวัดจำนวน 5 จุดจากนั้นนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยของ VH/CD

วิธีการวัดความสูงของวิลไลและความลึกของคริปท์ตามวิธีของ Tsirtsikos และคณะ (2012)

4.1 ความสูงของวิลไลวัดจาก villus tip ถึง villus-crypt junction

4.2 ความลึกของคริปท์วัดความลึกระหว่าง 2 วิลไลที่อยู่ติดกัน

การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design สำหรับข้อมูล การย่อยได้บริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย จำนวนจุลชีพในไส้ตันและสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กส่วนกลาง รวมถึงค่า pH ของของเหลวในลำไส้ นำข้อมูลจากไก่ 2 ตัวต่อซ้ำ มาหาค่าเฉลี่ย คิดเป็น 1 ข้อมูลต่อซ้ำ สำหรับข้อมูลด้านสมรรถภาพการเจริญเติบโตข้อมูลมาจาก 1 คอกต่อซ้ำ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มทดลองด้วย one-way ANOVA และนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มทดลอง โดยวิธีการ Duncan’s new multiple range test กำหนดระดับนัยสำคัญที่ P<0.05 (SAS, 2002)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4 ผลการทดลอง

อาหารทดลอง

ผลของการนำอาหารที่ใช้ในการทดลองมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการพบว่า อาหารระยะที่ 1 ระยะที่ 2 และระยะที่ 3 มีค่าพลังงานอยู่ที่ 3,050 กิโลแคลอรี่ 3,100 กิโลแคลอรี่และ 3,150 กิโลแคลอรี่ตามลำดับ มีค่าโปรตีนอยู่ที่ 215 กรัม 200 กรัมและ180 กรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ สำหรับส่วนประกอบอื่นๆ ได้แก่ ไขมัน เยื่อใย เถ้า แคลเซียมและฟอสฟอรัส แสดงในตารางที่ 5

สมรรถภาพการเจริญเติบโต

ผลของการเสริม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโต แสดงในตารางที่ 6 พบว่า ในช่วงอายุ 22-42 วันและ 1-42 วัน อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวของไก่กลุ่มที่ได้รับการเสริม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ Amoxycillin ทางด้านของอัตราการตายพบว่ากลุ่มที่ได้รับการเสริม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ทั้งสองระดับ มีอัตราการตายต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ Amoxycillin และกลุ่มควบคุม

การย่อยได้บริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย

ผลของการย่อยได้บริเวณลำไส้เล็กส่วนปลายพบว่าในวันที่ 42 ของการทดลองกลุ่มที่ได้รับการเสริม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ทั้งสองระดับมีค่าการย่อยได้ของวัตถุแห้ง (Dry matter) เพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) นอกจากนี้การเสริมสารเสริมชีวนะที่ระดับ 5×10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร ยังทำให้การย่อยได้ของโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ Amoxycillin ในขณะที่ค่าการย่อยได้ของไขมันพบว่าทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน แสดงในตารางที่ 7

จำนวนเชื้อแบคทีเรีย

ผลของการเสริม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรีย แสดงในตารางที่ 8 พบว่าในวันที่ 21 กลุ่มที่ได้รับ *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ทั้งสองระดับมีจำนวนเชื้อ Lactic acid bacteria และค่า *Lactobacillus : E. coli* ratio เพิ่มขึ้น

(P<0.05) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ Amoxycillin แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ในขณะที่วันที่ 42 ของการทดลอง ไก่ที่ได้รับอาหารเสริม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ที่ระดับ 5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร มีจำนวนเชื้อ *Bacillus* spp. และ Lactic acid bacteria เพิ่มขึ้น (P <0.05) ขณะที่ประชากร *E. coli* ลดลง (P<0.05) และเมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณ *Lactobacillus : E. coli* ratio พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารเสริมชีวนะที่ระดับ 5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมนี้ มีค่า *Lactobacillus : E. coli* ratio เพิ่มขึ้น (P <0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ Amoxycillin และกลุ่มควบคุม ส่วนเชื้อ *Salmonella* spp. พบว่าไม่มีการตรวจพบเชื้อชนิดนี้ในทุกกลุ่มการทดลอง

สัณฐานวิทยาในลำไส้

ในวันที่ 21 และ 42 ของการทดลอง ไก่กลุ่มที่ได้รับการเสริม *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* ทั้งสองระดับมีความสูงของวิลไลเพิ่มขึ้น (รูปที่ 1: T3 และ T4) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P <0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ Amoxycillin (รูปที่ 1: T2) และกลุ่มควบคุม (รูปที่ 1: T1) ในส่วนของความลึกของคริปท์พบว่ากลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ Amoxycillin มีความลึกของคริปท์น้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ดังแสดงในรูปที่ 1 (T2) นอกจากนี้การเสริมสารเสริมชีวนะที่ระดับ 5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่ามีแนวโน้มที่สามารถทำให้ความลึกของคริปท์น้อยลงได้เช่นเดียวกันในวันที่ 42 ของการทดลอง จากนั้นเมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณอัตราส่วนของวิลไลต่อคริปท์พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับการเสริม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ทั้งสองระดับและกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ Amoxycillin มีอัตราส่วนของวิลไลต่อคริปท์เพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในวันที่ 21 ของการทดลอง ส่วนในวันที่ 42 ของการทดลองกลุ่มที่ได้รับการเสริม *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* ที่ระดับ 5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหารและกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ Amoxycillin มีสัดส่วนของวิลไลต่อคริปท์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 9

pHของของเหลวในลำไส้

ผลของการเสริม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ในช่วง 1-42 วัน แสดงในตารางที่ 10 พบว่าค่า pH ของของเหลวในลำไส้บริเวณเหนือกึ่งกลางของลำไส้เล็กส่วนกลางของไก่เนื้อทุกกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง (กรัม/กิโลกรัม)

	Starter (1-21 วัน)	Grower (21-35 วัน)	Finisher (35-42 วัน)
พลังงาน (kcal/kg)	3,050	3,100	3,150
โปรตีน	215	200	180
ไขมัน	65	70	75
เยื่อใย	35	40	40
เถ้า	57.6	50.6	51.5
แคลเซียม	9	8.5	8
ฟอสฟอรัส	4	3.8	3.5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 6 ผลของการเสริม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโต

	อาหารทดลอง[1/]				SEM	P-value
	T1	T2	T3	T4		
วันที่ 1–21						
อัตราการเจริญเติบโต (ก./ตัว/วัน)	39.74	41.51	40.24	40.60	0.34	0.309
ปริมาณอาหารที่กิน (ก./ตัว/วัน)	63.33	63.97	63.57	65.86	0.51	0.296
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว	1.59	1.54	1.58	1.62	0.01	0.101
วันที่ 22–42						
อัตราการเจริญเติบโต (ก./ตัว/วัน)[2/]	66.60[b]	74.86[a]	74.46[a]	74.64[a]	1.09	0.008
ปริมาณอาหารที่กิน (ก./ตัว/วัน)	150.85	157.20	149.11	148.02	1.73	0.246
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว[2/]	2.29[b]	2.00[a]	2.10[ab]	1.98[a]	0.04	0.034
วันที่ 1–42						
อัตราการเจริญเติบโต (ก./ตัว/วัน)[2/]	53.17[b]	58.18[a]	57.35[a]	57.74[a]	0.63	0.007
ปริมาณอาหารที่กิน (ก./ตัว/วัน)	107.63	110.58	106.34	106.94	0.97	0.446
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว[2/]	2.03[b]	1.90[a]	1.86[a]	1.85[a]	0.02	0.029
อัตราการตาย (%)	5.00	6.67	1.67	0.00	0.98	0.053

[1/]อาหารทดลอง T1 = อาหารควบคุม, T2 = อาหารควบคุมเสริมด้วยยาปฏิชีวนะ Amoxycillin 200 มก./กก.อาหาร, T3 = อาหารควบคุมเสริมด้วย *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* 2.5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหารและT4 = อาหารควบคุมเสริมด้วย *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* 5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร ตามลำดับ

[2/] ค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรยกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$

ตารางที่ 7 ผลของการเสริม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ต่อการย่อยได้บริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย (%)

	อาหารทดลอง[1/]				SEM	P-value
	T1	T2	T3	T4		
สัมประสิทธิ์การย่อยได้ปรากฏวันที่ 21						
วัตถุแห้ง	0.65	0.69	0.68	0.68	0.01	0.087
โปรตีน	0.78	0.81	0.80	0.80	0.77	0.428
ไขมัน	0.75	0.78	0.77	0.77	1.63	0.908
สัมประสิทธิ์การย่อยได้ปรากฏวันที่ 42						
วัตถุแห้ง[2/]	0.70[b]	0.75[a]	0.73[a]	0.74[a]	0.01	0.002
โปรตีน[2/]	0.75[b]	0.81[a]	0.79[ab]	0.80[a]	0.76	0.034
ไขมัน	0.76	0.80	0.79	0.80	0.83	0.387

[1/]อาหารทดลอง T1 = อาหารควบคุม, T2 = อาหารควบคุมเสริมด้วยยาปฏิชีวนะ Amoxycillin 200 มก./กก.อาหาร, T3 = อาหารควบคุมเสริมด้วย *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* 2.5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหารและ T4 = อาหารควบคุมเสริมด้วย *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* 5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร ตามลำดับ

[2/] ค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรยกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 8 ผลของการเสริม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ต่อจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (log10 cfu/g)

	อาหารทดลอง[1/]				SEM	P-value
	T1	T2	T3	T4		
วันที่ 21						
Bacillus spp.	4.67	5.27	4.54	4.84	0.11	0.069
Lactic acid bacteria [2/]	7.24^{ab}	6.80^{b}	7.65^{a}	7.82^{a}	0.10	0.001
E. coli	4.97	4.52	4.69	4.67	0.07	0.15
Salmonella spp.	ND	ND	ND	ND	-	-
Lactobacillus : E. coli ratio[2/]	1.29^{a}	1.04^{b}	1.37^{a}	1.40^{a}	0.04	0.001
วันที่ 42						
Bacillus spp. [2/]	3.58^{c}	4.18^{b}	4.58^{a}	4.63^{a}	0.09	<.001
Lactic acid bacteria [2/]	6.90^{bc}	6.69^{c}	7.30^{ab}	7.57^{a}	0.10	0.010
E. coli[2/]	5.07^{b}	4.53^{a}	4.75^{ab}	4.55^{a}	0.08	0.037
Salmonella spp.	ND	ND	ND	ND	-	-
Lactobacillus : E. coli ratio[2/]	1.19^{b}	1.15^{b}	1.33^{ab}	1.49^{a}	0.03	0.001

[1/]อาหารทดลอง T1 = อาหารควบคุม, T2 = อาหารควบคุมเสริมด้วยยาปฏิชีวนะ Amoxycillin 200 มก./กก.อาหาร, T3 = อาหารควบคุมเสริมด้วย *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* 2.5 x 10^{7} โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหารและT4 = อาหารควบคุมเสริมด้วย *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* 5 x 10^{7} โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร ตามลำดับ

[2/] ค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรยกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

ND= Not Detected

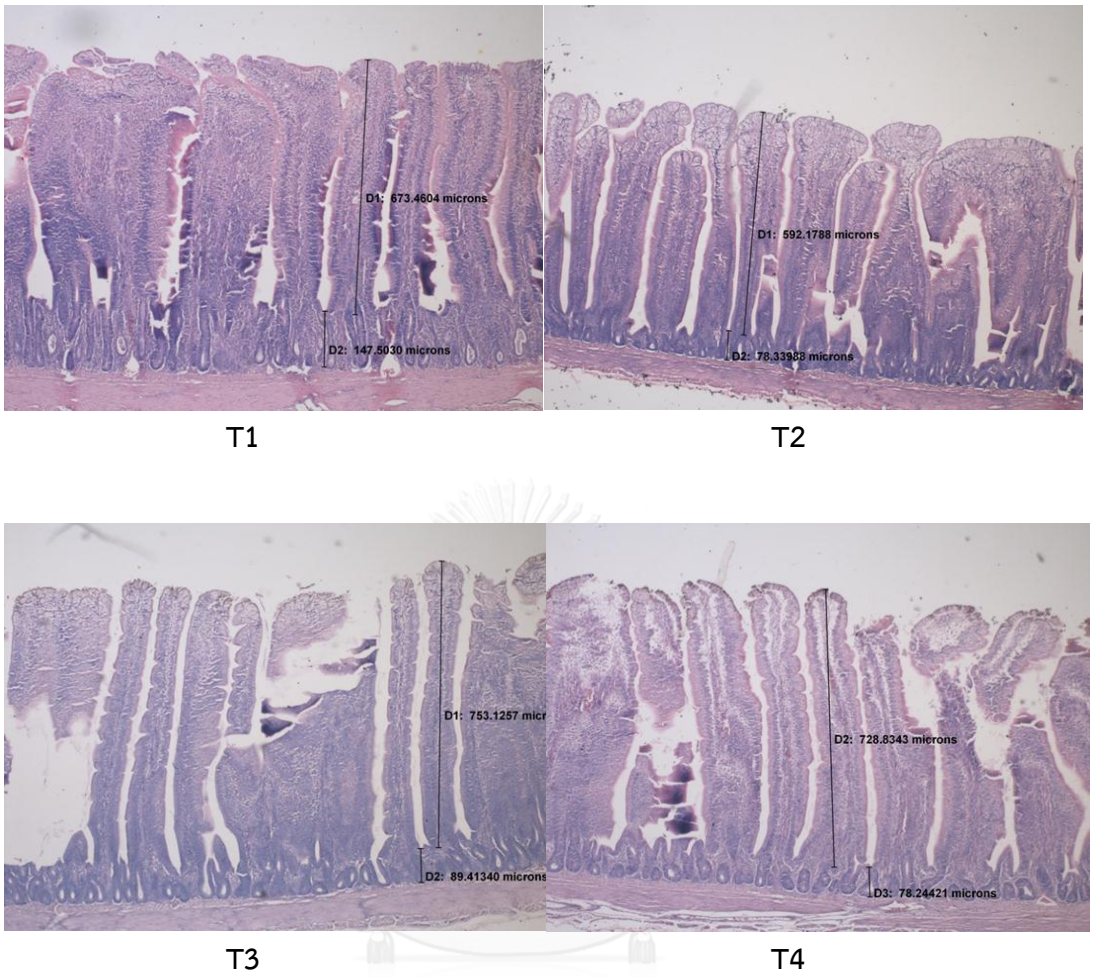
ตารางที่ 9 ผลของการเสริม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ต่อสัณฐานวิทยาในลำไส้ (µm)

	อาหารทดลอง[1/]				SEM	P-value
	T1	T2	T3	T4		
วันที่ 21						
ความสูงของวิลไล[2/]	546.36[b]	511.57[b]	719.06[a]	697.50[a]	1.15	<.001
ความลึกของคริปท์[2/]	80.01[a]	53.67[b]	82.61[a]	80.48[a]	3.03	<.001
สัดส่วนของวิลไลต่อคริปท์[2/]	6.97[b]	9.53[a]	8.78[a]	8.69[a]	0.26	<.001
วันที่ 42						
ความสูงของวิลไล[2/]	616.54[b]	554.19[c]	686.85[a]	675.28[a]	3.56	0.001
ความลึกของคริปท์[2/]	102.72[a]	68.59[b]	89.49[a]	82.59[ab]	3.45	0.001
สัดส่วนของวิลไลต่อคริปท์[2/]	6.38[b]	8.21[a]	7.60[ab]	8.45[a]	0.27	0.019

[1/]อาหารทดลอง T1 = อาหารควบคุม, T2 = อาหารควบคุมเสริมด้วยยาปฏิชีวนะ Amoxycillin 200 มก./กก.อาหาร, T3 = อาหารควบคุมเสริมด้วย *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* 2.5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหารและ T4 = อาหารควบคุมเสริมด้วย *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* 5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร ตามลำดับ

[2/] ค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรยกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P<0.05

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 1 แสดงสัณฐานวิทยาในลำไส้เล็กส่วนกลาง (µm) จากตัวอย่างในวันที่ 42 ของการทดลอง T1 = อาหารควบคุม, T2 = อาหารควบคุมเสริมด้วยยาปฏิชีวนะ Amoxycillin 200 มก./กก.อาหาร, T3 = อาหารควบคุมเสริมด้วย *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* 2.5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหารและT4 = อาหารควบคุมเสริมด้วย *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* 5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร

ตารางที่ 10 ผลของการเสริม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ต่อ pH ของของเหลวในลำไส้เล็กส่วนกลาง

	อาหารทดลอง[1/]				SEM	P-value
	T1	T2	T3	T4		
ตัวอย่างลำไส้เล็กส่วนกลาง						
วันที่ 21	6.16	6.27	6.09	6.17	0.03	0.277
วันที่ 42	5.98	6.31	5.80	5.92	0.10	0.304

[1/]อาหารทดลอง T1 = อาหารควบคุม, T2 = อาหารควบคุมเสริมด้วยยาปฏิชีวนะ Amoxycillin 200 มก./กก.อาหาร, T3 = อาหารควบคุมเสริมด้วย *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* 2.5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหารและ T4 = อาหารควบคุมเสริมด้วย *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* 5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5 วิจารณ์และสรุป

สมรรถภาพการเจริญเติบโต

ในการทดลองครั้งนี้พบว่าการเสริม *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* ในอาหารไก่มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นในช่วง 1-42 วัน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) โดยผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่มีการเสริม *Bacillus subtilis* (25 และ50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารของไก่เนื้อ) พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน ปริมาณการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อวัน (Khaksefidi and Ghoorchi, 2006) นอกจากนี้ Fritts และคณะ (2000) ก็ได้รายงานเช่นเดียวกันนี้ว่าการเสริม *Bacillus subtilis* C-3102 ในอาหารไก่เนื้อที่ระดับ1 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถเพิ่มอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวและอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันที่อายุ 42 วันได้ ซึ่งการเพิ่มสมรรถภาพการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการใช้อาหารของไก่เนื้อที่มาจากการเสริมสารเสริมชีวนะสายพันธุ์ต่างๆนั้น (Kabir et al., 2004) น่าจะเป็นผลที่เกิดมาจากกลไกการทำงานด้านต่างๆ ของสารเสริมชีวนะเช่น การเพิ่มปริมาณอาหารที่กินทำให้สัตว์กินอาหารได้มากขึ้นเนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดสังเคราะห์สารปรุงแต่งรสชาติธรรมชาติและสารเคมีหอมซึ่งสามารถกระตุ้นให้สัตว์เจริญอาหารมากขึ้น (คนึงนิจ, 2540) การเพิ่มการย่อยได้ของอาหาร (Shim et al., 2010) โดยการเพิ่มปริมาณของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยอาหารและการผลิตแอมโมเนียที่ลดลง (Jin et al., 1998) การรักษาสมดุลของประชากรจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร (Fuller, 1989) และเพิ่มการเผาผลาญของจุลินทรีย์ (Jin et al., 1996) ซึ่งปริมาณของจุลินทรีย์มีความสัมพันธ์กับความต้องการใช้พลังงานในตัวไก่ เนื่องจากหากจำนวนจุลินทรีย์ในลำไส้ยิ่งมาก ไก่จะได้รับพลังงานจากสารอาหารน้อยลงตามจำนวนจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยเป็นผลมาจากความต้องการพลังงานของจุลินทรีย์ในกระบวนการย่อยและดูดซึมสารอาหารจากตัวไก่ ดังนั้นหากมีเชื้อก่อโรคอยู่ในลำไส้ของไก่และเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ประสิทธิภาพในการดูดซึมอาหารของไก่จะลดลง ส่งผลโดยตรงต่ออัตราแลกเนื้อที่เกษตรกรจะได้รับซึ่งจะต่ำลงตามประสิทธิภาพการดูดซึมอาหารของไก่ด้วย (Kenny et al., 2011) ในขณะที่การเสริมสารเสริมชีวนะลงไปนั้น จะช่วยให้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคถูกยับยั้ง และลดจำนวนลงจากการทำงานด้านการแก่งแย่งพื้นที่ยึดเกาะพื้นผิวเยื่อบุลำไส้และสารอาหารจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ส่งผลให้การเจริญเติบโตและเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ดีขึ้น (Graminha et al., 2008) ช่วยให้ไก่ได้รับสารเมแทบอไลต์ที่มีประโยชน์จากการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์เช่น กรดอินทรีย์ (กรดแลคติก) เอนไซม์ (อะไมเลส และโพรทีเอส) และสารต้านจุลชีพ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้การเพิ่มสมรรถภาพการเจริญเติบโตอาจเกิดขึ้น

จากการย่อยได้ของอาหารที่เพิ่มขึ้น การปรับปรุงสุขภาพของลำไส้และจำนวนจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร สอดคล้องกับผลการทดลองของพารามิเตอร์ดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มที่ได้รับสารเสริมชีวนะทั้งสองระดับ มีอัตราการตายต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ Amoxycillin และกลุ่มควบคุม โดยอัตราการตายของไก่กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 อยู่ที่ 5.00%, 6.67%, 1.67% และ 0.00% ตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน Teo และคณะ (2007) รายงานว่าไก่เนื้อพันธุ์ Ross กลุ่มที่ได้รับสารเสริมชีวนะ *Bacillus subtilis* PB6 ที่ระดับ 1 x 10^8 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร มีอัตราการตายอยู่ที่ 3% ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะและกลุ่มควบคุมที่มีอัตราการตาย 8% และ 9% ตามลำดับ โดย Song และคณะ (2014) รายงานว่าอัตราการตายที่เพิ่มขึ้นในไก่เนื้ออาจเป็นผลมาจากความเครียดที่เกิดจากอากาศร้อน เพราะความเครียดจากความร้อนที่เกิดขึ้นส่งผลโดยตรงต่อสุขภาพของไก่เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด เช่นเชื้อ *E. Coli* ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นที่มีอยู่ไม่มากในทางเดินอาหาร แต่เมื่อไก่อยู่ในช่วงที่อ่อนแอหรือมีสุขภาพไม่ดี เชื้อก่อโรคที่มีจำนวนน้อยเหล่านี้จะกลายเป็นเชื้อฉวยโอกาสเพิ่มจำนวนและสร้างชีวพิษที่เป็นอันตรายต่อตัวไก่ และทำให้ไก่ตายได้ ซึ่งไก่ที่มีการตายในการทดลองครั้งนี้ก็อาจจะเป็นผลเนื่องมาจากความเครียดที่เกิดจากอากาศร้อนเช่นเดียวกัน เพราะในการทดลองมีการเลี้ยงไก่ในโรงเรือนแบบเปิด ซึ่งบางวันมีอุณหภูมิในโรงเรือนที่วัดได้สูงถึง 35 องศาเซลเซียส และการที่กลุ่มที่ได้รับสารเสริมชีวนะมีการตายที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะนั้น เป็นเพราะการเสริมสารเสริมชีวนะสามารถช่วยเพิ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และลดจำนวนเชื้อที่ก่อโรคได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ในพารามิเตอร์ดังกล่าว

การย่อยได้บริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย

จากการทดลองครั้งนี้พบว่าในวันที่ 42 ของการทดลอง กลุ่มที่ได้รับการเสริม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ทั้งสองระดับมีค่าการย่อยได้ของวัตถุแห้งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) นอกจากนี้การเสริมสารเสริมชีวนะที่ระดับ 5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร ยังทำให้การย่อยได้ของโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Kim และคณะ (2011) รายงานว่าสารเสริมชีวนะ (*Lactobacillus acidophilus* และ *Bacillus subtilis*) ที่ระดับ 1 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถเพิ่มการย่อยได้ของวัตถุแห้งและโปรตีน ซึ่งเป็นผลที่เกิดมาจากความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ในสารเสริมชีวนะเพิ่มขึ้น ในทางตรงข้ามการปรับปรุงการย่อยได้ของสารอาหารในไก่ที่ได้รับยาปฏิชีวนะนั้น เกิดจากการมีสารอาหารที่เหลือให้ไก่ดูดซึมและเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น เนื่องจากยาปฏิชีวนะจะเข้าไปยับยั้งการเจริญเติบโตและยับยั้งเมแทบอลิซึมของเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิดที่อยู่ในลำไส้ (Mountzouris et al., 2010) นอกจากนี้ Kim และคณะ (2011) รายงานว่า การทำงานของเอนไซม์และการดูดซึม

สารอาหารที่ถูกย่อยในลำไส้ ถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการย่อยได้ของอาหาร สารเสริมชีวนะสามารถเพิ่มการพัฒนาและการทำงานของของเอนไซม์ในไก่ได้ (Collington et al., 1990) จากการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (*Bacillus* spp., *Bifidobacteria* และ*Lactobacillus* spp.) ในระบบทางเดินอาหาร โดยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยอาหาร หรือสารอื่นๆ ที่เป็นโภชนะที่จำเป็นต่อสัตว์เช่น เบต้ากาแลคโตซิเดส เซลลูเลส โพรทีเอส และเพคติเนส เป็นต้น (Vicente et al., 2007) ส่งผลให้อาหารในระบบทางเดินอาหารเช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และแร่ธาตุถูกย่อยได้เพิ่มมากขึ้น (Simon et al., 2001) การใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะในสัตว์จึงเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย (Roselli et al., 2005) อีกทั้งยังเป็นการลดปริมาณสารอาหารที่เหลือสำหรับเชื้อแบคทีเรียก่อโรค อย่างไรก็ตามในวันที่ 21 ของการทดลองพบว่าค่าการย่อยได้ในแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งการย่อยได้ที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงอายุนี้อาจเกิดจากการพัฒนาการทำงานของเอนไซม์ในตัวไก่ รวมไปถึงการหลั่งกรดแอมิโนภายในเซลล์และเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่มีการเสริมเข้าไป (Li et al., 2008) ซึ่งนักวิจัยท่านอื่นได้รายงานในทำนองเดียวกันนี้ว่าการเสริมสารเสริมชีวนะในไก่เนื้อ สามารถเพิ่มการย่อยได้ที่ลำไส้เล็กส่วนปลายของโปรตีนและกรดแอมิโนต่างๆ 6-11% และเพิ่ม ADG ได้ประมาณ 8% ในวันที่ 42 เมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 21 ของการทดลอง (Li et al., 2008) เช่นเดียวกับรายงานของ Apata (2008) พบว่าสารเสริมชีวนะ (*Lactobacillus bulgaricus*) ที่ระดับ 1 x 10^6 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถเพิ่มการย่อยได้ของโปรตีนและไขมันในไก่เนื้ออายุ 42 วัน

จำนวนเชื้อแบคทีเรีย

การเสริมสารเสริมชีวนะ *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ในอาหารไก่เนื้อของการทดลองครั้งนี้พบว่า ไก่ที่ได้รับสารเสริมชีวนะที่ระดับ 5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร มีจำนวนเชื้อ *Bacillus* spp. และ Lactic acid bacteria เพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ Amoxycillin และกลุ่มควบคุม ขณะที่ประชากร *E. coli* ลดลง ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ เช่นเดียวกับรายงานของ Mountzouris และคณะ (2010) ซึ่งทำการศึกษาศักยภาพของสารเสริมชีวนะ (*Lactobacillus salivarius*) ที่ระดับ 1 x 10^8 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่าไก่ที่ได้รับสารเสริมชีวนะมีจำนวนเชื้อ *Lactobacillus* ในไส้ตันเพิ่มขึ้นและเชื้อ *E. coli* ลดลง ($P < 0.05$) แต่ในทางตรงกันข้าม Molnar และคณะ (2011) รายงานว่าการเสริม *Bacillus subtilis* ที่ระดับ 1 x 10^8 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหารไม่สามารถทำให้จำนวนเชื้อ Lactic acid bacteria ในลำไส้เล็กส่วนปลายหรือไส้ตันเพิ่มขึ้น ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มควบคุม (Jin et al., 1996) La Ragione และคณะ (2001) รายงานว่าการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ก่อโรค เป็นผลมากจากการแก่งแย่ง

พื้นที่ยึดเกาะผนังลำไส้ระหว่างสารเสริมชีวนะกับเชื้อก่อโรค ทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถตั้งถิ่นฐานในทางเดินอาหารของไก่ได้ โดย Neish (2002) รายงานว่าการยึดเกาะของสารเสริมชีวนะที่ครอบครองพื้นที่ของเซลล์เยื่อบุในระบบทางเดินอาหารเป็นกลไกการป้องกันโดยขัดขวางการเกาะติดของแบคทีเรียก่อโรคเช่น *E. coli* และ *Salmonella* spp. ซึ่ง Holzapfel และ Schillinger (2002) ได้อธิบายถึงกลไกในการเข้ายึดเกาะลำไส้สัตว์ว่าการยึดเกาะเริ่มตั้งแต่สารเสริมชีวนะเกาะติดกับผนังลำไส้แล้วก่อตัวเพิ่มจำนวนในส่วน luminal contents ของสัตว์ซึ่งทราบได้จากการศึกษาตัวอย่างกระเพาะอาหารของสุกรในกระเพาะพักและไส้ตันของไก่ต่อมาสารเสริมชีวนะจะยึดเกาะบริเวณ receptor ที่ผิวหน้าทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคถูกกำจัดออกไปจากลำไส้ (Gusils et al., 2002) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Duangjitcharoen และคณะ (2009) ที่รายงานว่าสารเสริมชีวนะ (*Lactobacillus plantarum* SS2) สามารถเกาะติดและอาศัยอยู่ในลำไส้ของหนูขาวได้ โดยทำการย้อมสีเรืองแสง ให้กับสารเสริมชีวนะสายพันธุ์คัดเลือกและป้อนให้หนูขาวกิน เมื่อเวลาผ่านไปจึงนำผนังลำไส้ส่วนต่างๆ ของหนูขาวมาตรวจสอบการเรืองแสงด้วยเครื่อง Flow cytometry พบว่าสารเสริมชีวนะที่หนูกิน มีการเกาะติดบริเวณลำไส้เล็ก ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ป้อนสารเสริมชีวนะ นอกจากนี้จากผลการทดลองในครั้งนี้จะเห็นได้ว่า การลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคนั้น การใช้สารเสริมชีวนะหรือยาปฏิชีวนะจะให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่องอาจทำให้เกิดการดื้อยาของจุลินทรีย์ก่อโรค อีกทั้งเกิดการตกค้างของสารในผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ ซึ่งส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคโดยตรง และยังมีผลทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารได้ โดยจะเห็นได้จากพารามิเตอร์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (*Bacillus* spp. และ Lactic acid bacteria) ในการทดลองครั้งนี้ที่พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารเสริมชีวนะมีจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มากกว่ากลุ่มที่ได้รับยา Amoxycillin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งผลของการทำลายเชื้อประจำถิ่นจากการใช้ยาปฏิชีวนะจะทำให้จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารขาดความสมดุลได้ (Capurso, 2001) ในขณะที่สารเสริมชีวนะสามารถรักษาและปรับความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ จากการผลิตสารต้านเชื้อแบคทีเรีย (เช่น กรดแลคติกและแบคเทอริโอซิน ที่สามารถลดการยึดเกาะของเชื้อ *E. coli* ได้) การยับยั้งและแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะกับเยื่อบุผิวลำไส้ และการยับยั้งการผลิตชีวพิษของเชื้อก่อโรค (Roselli et al., 2007) ซึ่งการรักษาความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้จากการใช้สารเสริมชีวนะที่กล่าวมาข้างต้นพบว่าสอดคล้องกับผลจากทดลองในครั้งนี้คือ อัตราส่วนของ *Lactobacillus : E. coli* ratio ในกลุ่มที่ได้รับสารเสริมชีวนะเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ Amoxycillin และกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับการทดลองของ Molna´r และคณะ (2011) ที่พบว่าอัตราส่วนของ *Lactobacillus : E. coli* ratio ในลำไส้เล็กส่วนปลายของไก่ที่ได้รับสารเสริมชีวนะ (*Bacillus subtilis*) ที่ระดับ 1×10^8 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหารเพิ่มขึ้น ($P<0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้การเพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ลดจำนวนเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค โดยอัตราส่วนของเชื้อที่มีประโยชน์ต่อเชื้อที่ก่อโรคเพิ่มขึ้นนั้น เป็นผลมาจากความสามารถในการเกาะติดผนังลำไส้ของสัตว์และความสามารถในการผลิตสารต้านเชื้อแบคทีเรียตามที่ได้ศึกษามาข้างต้น ทางด้านของเชื้อ *Salmonella* spp. จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าไม่มีการพบเชื้อชนิดนี้ในทุกกลุ่มการทดลอง สอดคล้องกับรายงานของ Molna´r และคณะ (2011) ที่มีการเสริม *Bacillus subtilis* ในอาหารไก่เนื้อพบว่า ไม่มีการตรวจพบเชื้อ *Salmonella* spp. ในลำไส้เช่นเดียวกัน

สัณฐานวิทยาในลำไส้

การศึกษาสัณฐานวิทยาในลำไส้ได้แก่ความสูงของวิลไล ความลึกของคริปท์ รวมทั้งสัดส่วนของวิลไลต่อคริปท์ เป็นตัวที่บ่งบอกถึงสุขภาพในลำไส้ของไก่ Salim และคณะ (2013) รายงานว่าไก่ที่มีสุขภาพลำไส้ดี เช่น วิลไลที่ยาวและหนา สามารถช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวที่ใช้ในการดูดซึมสารอาหารมาใช้ในการเจริญเติบโตและการสร้างผลผลิตในไก่ได้ (Loddi et al., 2004) ซึ่งสุขภาพของลำไส้ที่ดีนั้นไม่ได้มีผลดีต่อการใช้ประโยชน์สารอาหารเพียงอย่างเดียวแต่ยังส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายไก่อีกด้วย McReynolds และคณะ (2009) รายงานว่าหากลำไส้ของไก่มีความสมบูรณ์แข็งแรงดีสามารถช่วยป้องกันการติดเชื้อต่างๆที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรคได้ซึ่งในการทดลองครั้งนี้พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารเสริมชีวนะทั้งสองระดับมีความสูงของวิลไลเพิ่มขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะและกลุ่มควบคุมทั้งสองช่วงการทดลอง โดย Samanya และ Yamauchi (2002) ได้รายงานเช่นเดียวกันว่า ความสูงของวิลไลในลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนปลายเพิ่มขึ้นในไก่ที่ได้รับการเสริม *Bacillus subtilis* ที่ระดับ1 x 10^8 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร ทำนองเดียวกับ Gunal และคณะ (2006) ที่รายงานว่าการเสริมสารเสริมชีวนะ *Lactobacillus acidophilus* ที่ระดับ 6 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถเพิ่มความสูงของวิลไลในลำไส้เล็กส่วนกลางและส่วนปลายได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งในวันที่ 21 และ 42 ของการทดลอง ซึ่งการที่สารเสริมชีวนะสามารถเพิ่มความสูงของวิลไลได้นั้น เนื่องมาจากสารเสริมชีวนะมีส่วนช่วยในการลดการเกาะติดและตั้งถิ่นฐานของเชื้อก่อโรคที่มีส่วนในการทำลายเยื่อบุผิวของลำไส้ได้ จากการแก่งแย่งพื้นที่ยึดเกาะเยื่อบุผิวลำไส้ ผลิต exogenous enzymes เช่นโพรทีเอส อะไมเลส และไซลาเนส (Mathlouthi et al., 2002) ผลิตสารต้านเชื้อแบคทีเรีย และยับยั้งการผลิตชีวพิษของเชื้อก่อโรค ทำให้เยื่อบุผิวลำไส้ไม่มีการอักเสบหรืออักเสบน้อยลง การหมุนเวียนของ epithelium cell เพิ่มขึ้น ความสูงของวิลไลจึงเพิ่มขึ้น (Sharifi et al., 2012) นอกจากนี้ Santin และคณะ (2001) รายงานว่าความสูงของวิลไลที่เพิ่มขึ้นอาจเกิดจากการเสริมสารเสริมชีวนะกลุ่มยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae* ที่ระดับ 0.1

และ 0.2% ในอาหารไก่เนื้อ) ทำให้ได้รับกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acids) เพิ่มมากขึ้น และกรดไขมันสายสั้นที่ได้จากการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ในสารเสริมชีวนะเหล่านี้ จะไปกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนของ epithelium cell (Ichikawa et al., 1999) ซึ่ง Sakata และคณะ (1999) ได้รายงานในทำนองเดียวกันนี้ว่า การเสริมสารเสริมชีวนะ *Lactobacillus casei* ที่ระดับ 1 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถเพิ่มระดับการผลิต epithelium cell ในคริปท์ของลำไส้เล็กส่วนปลายของหนูได้ถึง 40% ในส่วนของกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะซึ่งมีความสูงของวิลไลน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับสารเสริมชีวนะเนื่องจาก การใช้ยาปฏิชีวนะจะไปจำกัดการขยายตัวเพื่อเพิ่มจำนวน และการตั้งถิ่นฐานของเชื้อจุลินทรีย์มีประโยชน์ในลำไส้เช่น *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* ทำให้เอนไซม์ที่ได้จากการผลิตของจุลินทรีย์มีน้อยลง (Mathlouthi et al., 2002) การผลิตกรดไขมันสายสั้นลดลง การหมุนเวียนของ epithelium cell ก็ลดลงตามการผลิตกรดไขมัน ส่งผลให้ความสูงของวิลไลลดลงตามไปด้วย (Oliveira et al., 2008) ทางด้านความลึกของคริปท์ จากการทดลองพบว่ากลุ่มที่ได้รับการเสริมยาปฏิชีวนะ Amoxycillin มีความลึกของคริปท์น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ซึ่ง Miles และคณะ (2006) รายงานว่า ความลึกของคริปท์ที่มากขึ้นเนื่องจากวิลไลมีการอักเสบจากการถูกทำลายโดยชีวพิษที่เชื้อก่อโรคผลิต ทำให้การหมุนเวียนของ epithelium cell ที่มีการสร้างในส่วนของคริปท์เพื่อขึ้นไปแทนที่ในส่วนของวิลไลนั้นเร็วขึ้น โดยการสร้าง epithelium cell จากคริปท์ขึ้นไปแทนที่อย่างรวดเร็วนี้ต้องใช้พลังงานสูง และสารอาหารสำหรับนำไปใช้ในการสร้าง epithelium cell นี้มีไม่เพียงพอ เมื่อวิลไลถูกทำลายจากชีวพิษมากๆ จึงทำให้อัตราการเจริญหรือการเพิ่มจำนวนของ epithelium cell ในคริปท์ลดลง ส่งผลให้คริปท์ลึกมากขึ้น (Teo and Tan, 2007) โดยในการทดลองครั้งนี้ กลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะมีความลึกของคริปท์น้อยกว่ากลุ่มอื่นนั้นอาจจะเกิดจาก เมื่อมีการเสริมยาปฏิชีวนะเข้าไปสามารถช่วยลดจำนวนเชื้อก่อโรคได้ ชีวพิษที่ได้รับจากเชื้อก่อโรคก็มีปริมาณน้อยลง ส่งผลให้การอักเสบของวิลไลลดลง การหมุนเวียนของ epithelium cell จึงเป็นไปอย่างปกติ (Uni et al., 1998) ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองของ Tsirtsikos และคณะ (2012) ก็รายงานในทำนองเดียวกันว่า ยาปฏิชีวนะสามารถลดความลึกของคริปท์ได้ โดยการเข้าไปทำลายเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิดในทางเดินอาหาร ส่งผลให้มีการลดลงของชีวพิษที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งเป็นสาเหตุในการทำให้เยื่อบุผิวลำไส้เสียหายหรืออักเสบและทำให้คริปท์ลึกขึ้น (Oliveira et al., 2008) ทั้งนี้ในวันที่ 42 ของการทดลอง การเสริมสารเสริมชีวนะที่ระดับ 5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่ามีแนวโน้มที่สามารถทำให้คริปท์ลึกน้อยลงได้เช่นเดียวกัน และเมื่อนำค่าที่ได้จากการทดลองมาคำนวณสัดส่วนของวิลไลต่อคริปท์พบว่า การเสริมยาปฏิชีวนะและสารเสริมชีวนะที่ระดับ 5 x 10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถเพิ่มสัดส่วนของวิลไลต่อคริปท์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ซึ่งผลที่ได้รับในการศึกษาครั้งนี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Samanya และ Yamauchi (2002) ที่ว่าสัดส่วนของวิลไลต่อคริปท์เพิ่มขึ้น

จากการเสริมสารเสริมชีวนะ *Bacillus subtilis* ที่ระดับ1 x 10^8 โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร เช่นเดียวกับรายงานของ Awad และคณะ (2010) ซึ่งได้ทำการเสริม *Lactobacillus salivarius* และ *Lactobacillus reuteri* ที่ระดับ1 x 10^8 โคโลนีต่อกิโลกรัมในอาหารไก่เนื้อ พบว่าสามารถเพิ่มสัดส่วนของวิลไลต่อคริปท์ได้ โดย Chiou และคณะ (1996) รายงานว่า การหาค่าสัดส่วนวิลไลต่อคริปท์จะทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพในการดูดซึมอาหารของลำไส้ได้ โดยสัดส่วนที่สูงแสดงว่ามีความสามารถในการดูดซึมสูง ซึ่งในการทดลองครั้งนี้สัดส่วนของวิลไลต่อคริปท์ในลำไส้เล็กส่วนกลางของกลุ่มที่ได้รับสารเสริมชีวนะและกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แสดงให้เห็นว่าการทำหน้าที่ดูดซึมสารอาหารในลำไส้เล็กส่วนกลางของสองกลุ่มนี้ดีกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในพารามิเตอร์สมรรถภาพการเจริญเติบโตของทั้งสองกลุ่มดังกล่าว และผลของลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ถือว่าเป็นไปในทิศทางเดียวกับรายงานของ Giannenas และคณะ (2012) ที่ได้อธิบายเกี่ยวกับสัณฐานวิทยาในลำไส้ว่าโครงสร้างของเยื่อบุผิววิลไลและความลึกของคริปท์ได้รับอิทธิพลจากอาหารที่ไก่ได้รับ กล่าวคือหากมีเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคปริมาณมากในลำไส้ สามารถเป็นตัวที่ชักนำให้เยื่อบุผิวของวิลไลในลำไส้มีการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ไม่ดีอย่างรวดเร็วเนื่องจาก เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคมีการผลิต ชีวพิษออกมาเช่น ชีวพิษชิกา (Shiga toxin) ที่ผลิตจากเชื้อ *E. coli* O157:H7 ซึ่งสามารถทำลายเยื่อบุผิวลำไส้ให้มีการอักเสบ ส่งผลโดยตรงต่อความสูงของวิลไลและความลึกของคริปท์ เพราะความสูงของวิลไลและสัดส่วนของวิลไลต่อคริปท์ที่เพิ่มขึ้น เกิดจากปริมาณการหมุนเวียน (turnover) ของ epithelial cell (Miles et al., 2006) ในทำนองเดียวกัน Yason และคณะ (1987) ก็ได้รายงานว่าพื้นผิวเยื่อบุของวิลไลในลำไส้กับสิ่งที่อยู่ในลำไส้มีความใกล้ชิดกันอย่างมาก การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ เช่น วิลไลที่สั้นลงหรือคริปท์ที่ลึกขึ้น จึงมีความสัมพันธ์กับปริมาณชีวพิษที่ได้รับจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

pHของของเหลวในลำไส้

Knarreborg และคณะ (2008) ศึกษากลไกการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจากการใช้สารเสริมชีวนะพบว่า สามารถต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคได้ โดยการสร้างข้อจำกัดของสภาพแวดล้อมในลำไส้ของสัตว์ ได้แก่การสร้างสภาวะแวดล้อมให้เป็นกรดโดยผลิตกรดอินทรีย์โดยเฉพาะกรดไขมันระเหยได้ เช่น กรดแลคติกอะซีติค โพรพิโอนิก และบิวทีริก เพื่อลดค่า pH ในลำไส้สัตว์ลงให้ไม่เหมาะสมสำหรับการขยายตัวของเชื้อจุลินทรีย์ใหม่และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค (Van Immerseel et al., 2006) แต่จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าค่า pH ในลำไส้ของไก่เนื้อทั้งสองช่วงการทดลอง (21 และ 42 วัน) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับการศึกษาของ Sergey และคณะ (2008) ที่ได้ทำการศึกษา

ผลของการเสริมสารเสริมชีวนะ (*Lactobacillus sobrius* DSM 16698 ที่ระดับ 1 x 10^{10} โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร) ต่อสุขภาพลำไส้รายงานว่า ค่า pH ในลำไส้เล็ก ไส้ตัน และลำไส้ใหญ่ของกลุ่มที่ได้รับสารเสริมชีวนะกับกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างกัน ในทางตรงข้าม Asahara และคณะ (2004) รายงานว่าสารเสริมชีวนะสายพันธุ์ *Bifidobacterium breve* ที่ระดับ 1 x 10^{9} โคโลนีต่อมิลลิลิตร สามารถผลิตกรดอะซีติค ซึ่งส่งผลให้ค่า pH ในลำไส้เล็กของหนูทดลองต่ำลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทำให้สามารถเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดในหนูทดลองได้ อย่างไรก็ดีค่า pH ในลำไส้ที่ไม่มีความแตกต่างกันนี้ Sergey และคณะ (2008) อธิบายว่าค่า pH ที่ลดลงเป็นเพียงสิ่งที่เกิดขึ้นตามมาจากการทำหน้าที่ของกลไกหลักอื่นๆ เช่น การผลิตกรดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อก่อโรค (Klein et al., 1998) ดังนั้นค่าของ pH ในลำไส้ที่ลดลงจึงยังไม่ชัดเจน

ในการทดลองครั้งนี้มีการใช้สารเสริมชีวนะที่ระดับ 2.5 x 10^{7} และ 5 x 10^{7} โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร ซึ่งถือว่าอยู่ในช่วงที่แนะนำว่ามีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดคืออยู่ในช่วง 10^{7}–10^{9} โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร (Patterson and Burkholder, 2003) โดยผลของสมรรถภาพการเจริญเติบโต การย่อยได้ของโปรตีน และค่าสัณฐานวิทยาในลำไส้ของไก่ที่ได้รับสารเสริมชีวนะที่ระดับ 5 x 10^{7} โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะ Amoxycillin แต่ดีกว่ากลุ่มควบคุม ในขณะที่ผลของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อตัวสัตว์ (Lactic acid bacteria และ *Bacillus* spp.) มีจำนวนสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาปฏิชีวนะและกลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงสามารถนำสารเสริมชีวนะที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มาใช้เป็นสารเสริมการเจริญเติบโตในไก่เนื้อ ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะที่มีปัญหาในเรื่องของสารตกค้างในเนื้อไก่ได้

สรุปผลการทดลอง

ผลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การเสริม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ระดับ 2.5 x 10^{7} และ 5 x 10^{7} โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถเพิ่มสมรรถภาพการเจริญเติบโตในไก่ได้ ในขณะที่การเสริม *Bacillus subtilis และ Bacillus licheniformis* ที่ระดับ 5 x 10^{7} โคโลนีต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถเพิ่มการย่อยได้ ปรับปรุงความสมดุลของจุลินทรีย์และสัณฐานวิทยาในลำไส้ได้ดีกว่าและยังสามารถใช้แทนยาปฏิชีวนะในไก่เนื้อได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

เกรียงศักดิ์ สายธนู. 2533. โรคติดเชื้อ อีเชอร์ริเชีย โคลัย ในระบบหายใจของไก่กระทง. ตอนที่ 1 ความชุกของโรค. เวชสารสัตวแพทย์. 20: 313-330.

คนึงนิจ ก่อธรรมฤทธิ์ 2540. การศึกษาและวิเคราะห์สถานภาพและศักยภาพการผลิตการใช้และความต้องการ Probiotics ของอุตสาหกรรมอาหารสัตว์. เอกสารทางวิชาการ.กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์. กรมปศุสัตว์.

ธวัชชัย โพธิ์เฮือง, เชิดชัย รัตนเศรษฐากุลและกัลยา เจือจันทร์. 2547. ประสิทธิภาพของการใช้สารเสริมชีวนะในอาหารไก่. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. ปีที่ 14. เล่ม 2(ก.ค.-ธ.ค. 2547): 52-61.

วรการ ชิตานนท์, สุภาพร อิสริโยดม, ปราโมทย์ ศิริโรจน์, ปทุมพร ฉิมเอนก, วรรณา มาลาพันธุ์, บุษา ยงสมิทธิ์, ชนินทร์ ติรวัฒนวานิช, วราภรณ์ หิรัญวงษ์และปกรณ์ ตาลสุข. 2550 ผลของการเสริมโปรไบโอติกส์ ต่อจำนวนประชากรเชื้อ *E. coli* ในลำไส้และการสร้างภูมิคุ้มกันต่อวัคซีนโรคนิวคาสเซิลในไก่กระทง. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 (สาขาสัตว์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 43-50.

สำนักงานการค้าต่างประเทศ. 2558. แนวโน้มการส่งออกสินค้าไก่เนื้อปี 2557. กรมการค้าต่างประเทศ. 1 มิถุนายน 2558.

Adler-Nissen J 1986. Enzymic Hydrolysis of food Proteins. Elsevier Applied Science Publishers.

Ahmad I 2006. Effect of probiotics on broilers performance. Poult Sci. 5: 593-597.

Ammor S, Tauveron G, Dufour E and Chevallier I 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Cont. 17(6): 454-461.

Angkanaporn K, Ravindran V and Bryden WL 1996. Additivity of apparent and true ileal amino acid digestibilities in soybean meal, sunflower meal, and meat and bone meal for broilers. Poult Sci. 75(9): 1098-1103.

AOAC 1990. Official Method of Analysis.Association of Official Analytical Chemists. 15th ed. Washington D.C., USA.

Apata DF 2008. Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus bulgaricus*. J Sci Food Agric. 88: 1253–1258.

Asahara T, Shimizu K, Nomoto K, Hamabata T, Ozawa A and Takeda Y 2004. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun. 72(4): 2240-2247.

Aviagen 2012. "ROSS 308 Broiler: Performance Objectives". [Online]. Available: http://www.en.aviagen.com/assets/Tech_Center/Ross_Broiler/Ross-308-Broiler-PO-2014-EN. pdf.

Barrow AP 1994. The microflora of the alimentaly tract and avian pathogens: translocation and vertical transmission. Microbiol Avian Eggs. (1sted. Bord GR and Fuller R (eds). Chapman & Hall, London): 119-122.

Breed R, Murray E and Smith R1957. Bergey's manual of determinative bacteriology 7 ed. The Williams & wilkins company, Baltimore. 1130 pp.

Brink B, Minekus M, van der Vossen JM, Leer RJ and Huis in't Veld JH 1994. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. J Appl Bacteriol. 77(2): 140-148.

Capurso L 2001. Probiotics and prebiotics and food intolerance. Allergy. 56: 125-126.

Carol C, Herman G and Christina G 2011. Restricting Antimicrobial Use in Food Animals. Lessons from Europe. Microbe. 6: 274-279.

Chandramouli V, Kailasapathy K, Peiris P and Jones M 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. J Microbiol Meth. 56(1): 27-35.

Chiang BL, Sheih YH, Wang LH, Liao CK and Gill HS 2000. Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. Eur J Clin Nutr. 54(11): 849-855.

Chiou P, Lu T, Hsu J and Yu B 1996. Effect of different sources of fiber on the intestinal morphology of domestic geese. Asian Aust J Anim Sci. 4: 539–550.

Collington GK, Parker DS and Armstrong DG 1990. The influence of inclusion of either an antibiotic or a probiotic in the diet on the development of digestive enzyme activity in the pig. Br J Nutr. 64(1): 59-70.

Dicks M and Loon T 1993. Lactic acid bacteria, understanding the microorganism.In : The Keys to Successful Use in Maximizing Anti-Coliform and Anti-*Salmonella* Activity. Proc. of Alltech's 9th Ann SympBiotech. Feed Industry Alltech Inc., USA. 151-168.

Duangjitcharoen Y, Kantachote D, Ongsakul M, Poosaran N and Chaiyasut C 2009. Potential use of probiotic *Lactobacillus plantarum* SS2 isolated from a fermented plant beverage: safety assessment and persistence in the murine gastrointestinal tract. World J Microb Biot. 25(2): 315-321.

FAO/WHO ER 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. World Health Organization. October.

Fritts CA, Kersey JH, Motl MA, Kroger EC, Yan F, Si J, Jiang Q, Campos MM, Waldroup AL and Waldroup PW 2000. *Bacillus subtilis* C-3102 (Calsporin) Improves Live Performance and Microbiological Status of Broiler Chickens. J Appl Poultry Res. 9(2): 149-155.

Fuller R 1989. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol. 66(5): 365-378.

Gaggia F, Mattarelli P and Biavati B 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. Int J Food Microbiol. 141 Suppl 1: S15-28.

Giannenas I, Papadopoulos E, Tsalie E, Triantafillou E, Henikl S, Teichmann K and Tontis D 2012. Assessment of dietary supplementation with probiotics on performance, intestinal morphology and microflora of chickens infected with *Eimeria tenella*. Vet Parasitol. 188(1-2): 31-40.

Gibson GR and Fuller R 2000. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. J Nutr. 130(2S Suppl): 391s-395s.

Graminha EBN, Gonçalves AZL, Pirota RDPB, Balsalobre MAA, Da Silva R and Gomes E 2008. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. Anim Feed Sci Tech. 144(1–2): 1-22.

Gunal M, Yayli G, Kaya O, Karahan N and Sulak O 2006. The Effects of Antibiotic Growth Promoter, Probiotic or Organic Acid Supplementation on Performance, Intestinal Microflora and Tissue of Broilers. Int J Poult Sci. 5: 149-155.

Gusils C, Bujazha M and González S 2002. Preliminary studies to design a probiotic for use in swine feed. Interciencia. 27: 409-413.

Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J and Williams S 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed. Philadelphia. Williams and Willkins. 522

Holzapfel WH and Schillinger U 2002. Introduction to pre- and probiotics. Food Res Int. 35(2–3): 109-116.

Hong HA, Duc le H and Cutting SM 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS Microbiol Rev. 29(4): 813-835.

Ichikawa H, Kuroiwa T, Inagaki A, Shineha R, Nishihira T, Satomi S and Sakata T 1999. Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat. Dig Dis Sci. 44(10): 2119-2123.

Inhouse method WA-boHPAASMF 2005. Enumeration of *Bacillus cereus* and other Bacillus species. National standard method. Health Protection Agency. SOP F15. 1: 1-15.

ISO 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 ºC.

ISO 2002. 3rd ed. Microbiology – General guidance on method for the detection of *Salmonella*.

ISO 2005. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive *Escherichia coli* – Most probable number technique.

Isolauri E, Salminen S and Ouwehand A 2004. Probiotics. Best Practice & Res. Clin Gastroenterol. 18: 299-313.

Jin LZ, Ho YW, Abdullah N and Jalaludin S 1998. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. Poult Sci. 77(9): 1259-1265.

Chulalongkorn University

Jin LZ, Ho YW, Abdullah N and Jalaudin S 1996. Influence of dried *Bacillus substillis* and *lactobacilli* cultures on intestinal microflora and performance in broilers. Asian Aust J Anim Sci. 9(4): 397-404.

Kabir S, Rahman M, Rahman M and Ahmed S 2004. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. Int J Poult Sci. 3: 361–364.

Karpinska E, Blaszczak B, Kosowska G, Degorski A and Borzemska B 2001. Growth of the intestinal anaerobes in the newly hatcked chicks according to the feeding and providing with normal gut flora. Bull Vet Inst. 45: 105-109.

Kenny M, Smidt H, Mengheri E and Miller B 2011. Probiotics - do they have a role in the pig industry. Anim. 5(3): 462-470.

Khaksefidi A and Ghoorchi T 2006. Effect of probiotic on performance and immunocompetence in broiler chicks. Poult Sci. 43: 296-300.

Kim JS, Ingale SL, Kim YW, Kim KH, Sen S, Ryu MH, Lohakare JD, Kwon IK and Chae BJ 2012. Effect of supplementation of multi-microbe probiotic product on growth performance, apparent digestibility, cecal microbiota and small intestinal morphology of broilers. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 96(4): 618-626.

Klein G, Pack A, Bonaparte C and Reuter G 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol. 41(2): 103-125.

Knarreborg A, Brockmann E, Høybye K, Knap I, Lund B, Milora N and Leser T 2008. *Bacillus subtilis* (DSM17299) modulates the ileal microbial communities and improves growth performance in broilers. Int J. 3: 83–88.

La Ragione RM, Casula G, Cutting SM and Woodward MJ 2001. *Bacillus subtilis* spores competitively exclude *Escherichia coli* O78:K80 in poultry. Vet Microbiol. 79(2): 133-142.

Lee KW, Lee SH, Lillehoj HS, Li GX, Jang SI, Babu US, Park MS, Kim DK, Lillehoj EP, Neumann AP, Rehberger TG and Siragusa GR 2010. Effects of direct-fed microbials on growth performance, gut morphometry, and immune characteristics in broiler chickens. Poult Sci. 89(2): 203-216.

Li L-L, Hou Z-P, Li T-J, Wu G-Y, Huang R-L, Tang Z-R, Yang C-B, Gong J, Yu H, Kong X-F, Pan E, Ruan Z, Xhu W-Y, Deng Z-Y, Xie M, Deng J, Yin F-G and Yin Y-L 2008. Effects of dietary probiotic supplementation on ileal digestibility of nutrients and growth performance in 1- to 42-day-old broilers. J Sci Food Agr. 88(1): 35-42.

Lilly DM and Stillwell RH 1965. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. Science. 147(3659): 747-748.

Lin WH, Yu B, Jang SH and Tsen HY 2007. Different probiotic properties for *Lactobacillus* fermentum strains isolated from swine and poultry. Anaerobe. 13(3-4): 107-113.

Loddi M, Moraes V, Nakaghi L, Tuca F, Hannas M and Ariki J 2004. Mannan oligosaccharide, organic acids on performance and intestinal morphometric characteristic of broilers chickens. Proc. 20th Alltech's Ann. Anim. Health and Nutr. Symp. Nicholasville. KY. 45 (Abstr.).

Lodemann U, Hubener K, Jansen N and Martens H 2006. Effects of *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 as probiotic supplement on intestinal transport and barrier function of piglets. Arch Anim Nutr. 60(1): 35-48.

Macfarlane GT and Cummings JH 1999. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health BMJ : Brit Med J. 318(7189): 999-1003.

Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B and Tsakalidou E 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. Int Dairy J. 16(3): 189-199.

Mathlouthi N, Lalles JP, Lepercq P, Juste C and Larbier M 2002. Xylanase and beta-glucanase supplementation improve conjugated bile acid fraction in intestinal contents and increase villus size of small intestine wall in broiler chickens fed a rye-based diet. J Anim Sci. 80(11): 2773-2779.

Maxwell C, Buchanan D, Owens F, Gilliland S, Luce W and Vencl R 1983. Effect of probiotic supplementation on performance, fecal parameters and digestibility in growing-finishing swine. Anim Sci. 114-157.

Chulalongkorn University

McAuliffe O, Ross RP and Hill C 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbiol Rev. 25(3): 285-308.

McReynolds J, Waneck C, Byrd J, Genovese K, Duke S and Nisbet D 2009. Efficacy of multistrain direct-fed microbial and phytogenetic products in reducing necrotic enteritis in commercial broilers. Poult Sci. 88(10): 2075-2080.

Miles RD, Butcher GD, Henry PR and Littell RC 2006. Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology. Poult Sci. 85(3): 476-485.

Molnar AK, Podmaniczky B, Kurti P, Tenk I, Glavits R, Virag G and Szabo Z 2011. Effect of different concentrations of *Bacillus subtilis* on growth performance, carcase quality, gut microflora and immune response of broiler chickens. Br Poult Sci. 52(6): 658-665.

Mountzouris KC, Tsitrsikos P, Palamidi I, Arvaniti A, Mohnl M, Schatzmayr G and Fegeros K 2010. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. Poult Sci. 89(1): 58-67.

Murry A, Hinton A and Morrison H 2004. Inhibition of growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Clostridia perfringens* on chicken feed media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. Int J Poult Sci. 9: 603-607.

Neish AS 2002. The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. Microbes Infect. 4(3): 309-317.

Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ and Knight SC 2009. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. Inflamm Bowel Dis. 15(2): 300-310.

Nicholson WL, Munakata N, Horneck G, Melosh HJ and Setlow P 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. Microbiol Mol Biol Rev. 64(3): 548-572.

North O 1984. Animal Science Textbook Series.Commercial Chicken Production 3rd ed. AVI Puplishing. USA.

Oliveira M, Rodrigues E, Marques R, Gravena R, Guandolini G and Moraes V 2008. Performance and morphology of intestinal mucosa of broilers fed

Chulalongkorn University

mannanoligosaccharides and enzymes. Arq Bras Med Vet. 60(Zootec): 442-448.

Opanlinski M, Maiorka A, Dahlke F, Cunha F, Vargas F and Cardozo E 2007. On the use of probiotic (*Bacillus subtilis*-strain DSM 17299) as growth promoter in broiler diets. Poult Sci. 9: 99–103.

Parkhurst C and Mountney G 1988. Poultry Meat and Egg Production. Chapman & Hall, New York.

Pascual M, Hugas M, Badiola JI, Monfort JM and Garriga M 1999. *Lactobacillus salivarius* CTC2197 Prevents *Salmonella enteritidis* Colonization in Chickens. Appl Environ Microb. 65(11): 4981-4986.

Patterson JA and Burkholder KM 2003. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. Poult Sci. 82(4): 627-631.

Paul WJJ, Biesterveld S, Notermans S, Hofstra H, Urlings BAP and van Knapen F 2000. Role of Volatile Fatty Acids in Development of the Cecal Microflora in Broiler Chickens during Growth. Appl Environ Microb. 66(6): 2536-2540.

Roselli M, Alberto F, Maria Serena B, Paolo B, Isabelle O and Elena M 2005. Alternatives to in-feed antibiotics in pigs: Evaluation of probiotics, zinc or organic acids as protective agents for the intestinal mucosa. A comparison of in vitro and in vivo results. Anim Res. 54(3): 203-218.

Roselli M, Finamore A, Britti MS, Konstantinov SR, Smidt H, de Vos WM and Mengheri E 2007. The novel porcine Lactobacillus sobrius strain protects intestinal cells from enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 infection and prevents membrane barrier damage. J Nutr. 137(12): 2709-2716.

Sakata T, Kojima T, Fujieda M, Miyakozawa M, Takahashi M and Ushida K 1999. Probiotic preparation dose-dependently increase net production rates of organic acids and decrease that of ammonia by pig caecal bacteria in batch culture. Digest Dis Sci. 44: 1485-1493.

Salim HM, Kang HK, Akter N, Kim DW, Kim JH, Kim MJ, Na JC, Jong HB, Choi HC, Suh OS and Kim WK 2013. Supplementation of direct-fed microbials as an alternative to antibiotic on growth performance, immune response, cecal

microbial population, and ileal morphology of broiler chickens. Poult Sci. 92(8): 2084-2090.

Samanya M and Yamauchi K 2002. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. natto. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Mol & Integrat Physiol. 133(1): 95-104.

Santin E, Maiorka A, Macari M, Grecco M, Sanchez JC, Okada TM and Myasaka AM 2001. Performance and Intestinal Mucosa Development of Broiler Chickens Fed Diets Containing Saccharomyces cerevisiae Cell Wall. J Appl Poultry Res. 10(3): 236-244.

SAS 2002. SAS/SAT Guide for personal computers. Version 9.00 ed. SAS Inst., Inc., Carry, NC.

Sen S, Ingale SL, Kim YW, Kim JS, Kim KH, Lohakare JD, Kim EK, Kim HS, Ryu MH, Kwon IK and Chae BJ 2012. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. Res Vet Sci. 93(1): 264-268.

Sergey K, Smidt H, Akkermans AD, Casini L, Trevisi P, Mazzoni M, De Filippi S, Bosi P and de Vos WM 2008. Feeding of *Lactobacillus sobrius* reduces *Escherichia coli* F4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets. FEMS Microbiol Ecol. 66(3): 599-607.

Sharifi SD, Dibamehr A, Lotfollahian H and Baurhoo B 2012. Effects of flavomycin and probiotic supplementation to diets containing different sources of fat on growth performance, intestinal morphology, apparent metabolizable energy, and fat digestibility in broiler chickens. Poult Sci. 91(4): 918-927.

Shim YH, Shinde PL, Choi JY, Kim JS, Seo DK, Pak JI, Chae BJ and Kwon IK 2010. Evaluation of Multi-microbial Probiotics Produced by Submerged Liquid and Solid Substrate Fermentation Methods in Broilers. Asian Aust J Anim Sci. 23(4): 521-529.

Simon O, Jadamus A and Vahjen W 2001. Probiotic feed additives-effectiveness and expected modes of action. J Anim Feed Sci. 10: 51–67.

Sneath P, Mair N, Sharpe M and Holt J 1986. Bergey's Manual of Systermatic Bacteriology V.2. Baltimore Meryland. 1599 pp.

Song J, Xiao K, Ke YL, Jiao LF, Hu CH, Diao QY, Shi B and Zou XT 2014. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. Poult Sci. 93(3): 581-588.

Sturkie P 1976. Avian physiology. 3rd ed. New York: Springer-verlag.

Teo AY and Tan H-M 2007. Evaluation of the Performance and Intestinal Gut Microflora of Broilers Fed on Corn-Soy Diets Supplemented With *Bacillus subtilis* PB6 (CloSTAT). J Appl Poultry Res. 16(3): 296-303.

Toghyani M and Tabeidian S 2011. Effect of probiotic and prebiotic as antibiotic growth promoter substitutions on productive and carcass traits of broiler chicks. International Conference on Food Engineering and Biotechnology IPCBEE. 9(IACSIT Press, Singapore).

Tsai CC, Hsih HY, Chiu HH, Lai YY, Liu JH, Yu B and Tsen HY 2005. Antagonistic activity against *Salmonella* infection in vitro and in vivo for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. Int J Food Microbiol. 102(2): 185-194.

Tsirtsikos P, Fegeros K, Balaskas C, Kominakis A and Mountzouris KC 2012. Dietary probiotic inclusion level modulates intestinal mucin composition and mucosal morphology in broilers. Poult Sci. 91(8): 1860-1868.

Uni Z, Platin R and Sklan D 1998. Cell proliferation in chicken intestinal epithelium occurs both in the crypt and along the villus. J Comp Physiol B. 168(4): 241-247.

Van Immerseel F, Russell JB, Flythe MD, Gantois I, Timbermont L, Pasmans F, Haesebrouck F and Ducatelle R 2006. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. Avian Pathol. 35(3): 182-188.

Veerle S, Eric C, Frank V, Jussi J and Bruno M 2004. Influence of porcine intestinal pH and gastric digestion on antigenicity of F4 fimbriae for oral immunization. Vet Microbiol. 98: 45–53.

Vicente J, Aviña L, Torres-Rodriguez A, Hargis B and Tellez G 2007. Effect of a *Lactobacillus* spp.-based probiotic culture product on broiler chicks performance under commercial conditions. Int J Poult Sci. 6: 154–156.

Chulalongkorn University

Wu BQ, Zhang T, Guo LQ and Lin JF 2011. Effects of *Bacillus subtilis* KD1 on broiler intestinal flora. Poult Sci. 90(11): 2493-2499.

Xiaolu L, Yan H, Lv L, Xu Q, Yin C, Zhang K, Wang P and Hu J 2012. Growth performance and meat quality of broiler chickens supplemented with *Bacillus licheniformis* in drinking water. Asian Aust J Anim Sci. 25(5): 682-689.

Yason CV, Summers BA and Schat KA 1987. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys: pathology. Am J Vet Res. 48(6): 927-938.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศศิ วิมล เกิดเมื่อวันที่ 16 มิถุนายน 2533 ที่อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะทรัพยากรธรรมชาติ สาขาสัตวศาสตร์ จากมหาวิทยาสงขลานครินทร์ เมื่อปีการศึกษา 2555 และได้ศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในภาคเรียนที่ 1 ปีการศึกษา 2556

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University