บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

การแยก*Lactobacillus* spp. จากลำไส้ไก่ซึ่งได้จากตลาดสดแหล่งต่างๆในกรุงเทพมหานคร โดยใช้อาหารจำเพาะต่อพวก *Lactobacillus* spp. เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อแลคโตแบซิลไล เอ็มอาร์เอส ซึ่งมีบรอมเครซอลเพอเพิลเป็นอินดิเคเตอร์ (pH 5.2 - 6.8)เลือกโคโลนีที่สามารถเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลือง เนื่องจาก *Lactobacillus* spp. สามารถสร้างกรดอินทรีย์เช่นกรดแลคติก (Ingram,1956) จึงมีผลทำให้บริเวณรอบๆโคโลนีมีความเป็นกรดและเมื่อนำเอาโคโลนีที่มีสีเหลืองเหล่านั้นมาทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลสจะให้ผลเป็นลบเนื่องจาก *Lactobacillus* spp. ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลส (Gotz, 1986) ซึ่งโดยปกติในขบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจนอะตอมของไฮโดรเจนจะรวมตัวกับออกซิเจน ทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และผลของการย้อมสีแกรมปรากฏว่าเป็นเชื้อแกรมบวกรูปแท่ง, แท่งค่อนข้างกลมซึ่งผลของการย้อมแกรมและการทดสอบเอนไซม์คาตาเลสจะสามารถแยก *Lactobacillus* spp. ออกจากเชื้อพวกแบซิลไล และเชื้อวงศ์ Enterobacteriaceae เพราะจะให้ผลการทดสอบเป็นบวก ปรากฏว่าสามารถแยก *Lactobacillus* spp. ได้ทั้งสิ้น 28 สายพันธุ์ จากตัวอย่างลำไส้ไก่ทั้งสิ้น 54 ตัวอย่าง ปรากฏว่า แยกสายพันธุ์ *Lactobacillus* spp. ได้น้อยกว่าที่ควรจะเป็น อาจเป็นเพราะลำไส้ไก่นั้นมีอายุนานเกินไป เนื่องจากไม่สามารถที่จะทำการเก็บลำไส้ไก่ได้ทันทีหลังจากการฆ่าไก่ เชื้อ *Lactobacillus* spp. อาจจะตายเนื่องจากทนต่อสิ่งแวดล้อมไม่ได้จึงเป็นผลทำให้ได้สายพันธุ์ *Lactobacillus* spp. น้อยกว่าที่ควรจะเป็น ทำการเก็บเชื้อทั้ง 28 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงเพื่อแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์สำหรับนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ และจัดจำแนกชนิดของ *Lactobacillus* spp. ต่อไป

การทดสอบความสามารถของล.อ.บ.ในการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยการนำส่วนใสของ *Lactobacillus* spp. อายุ 24ชั่วโมง มีค่า pH ประมาณ 3.3-4.0 ซึ่งส่วนน้ำใสจะมีสภาวะเป็นกรดที่เกิดจากการสร้างโดย *Lactobacillus* spp. (Ingram, 1956) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องนำส่วนใสนี้มาปรับค่า pH ให้ได้ประมาณ 6.5 เพื่อขจัดปัญหาข้อสงสัยว่าการเกิดบริเวณใสนั้น เป็นผลเนื่องจากกรดแลคติกหรือเป็นผลมาจากการต่อต้านจุลชีพที่เชื้อสร้างขึ้นส่วนผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถตัดปัญหานี้ได้โดยทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะขาดออกซิเจนทำให้ไม่เกิดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมา (Gotz, 1986) ดังนั้น บริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆ หลุม (บริเวณที่เชื้อทดสอบไม่สามารถเจริญได้) จึงสามารถบอกได้ว่าเกิดจากผลของสารต่อต้านจุลชีพที่ *Lactobacillus* spp.

สร้างขึ้นเองซึ่งจาก *Lactobacillus* spp. 28 สายพันธุ์ สามารถคัดเลือก *Lactobacillus* spp. ได้ 6 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตสารต่อต้านจุลชีพมาใช้เป็นโพรไบโอติกเสริมอาหารไก่ เมื่อทำการทดสอบโดยวิธี Agar Diffusion (ขจร, 2536) วิธีนี้มีข้อดี คือ ง่ายสะดวก,ได้ผลดี ,สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและเวลาน้อยที่สุด วิธีนี้ยังสามารถช่วยให้ทราบว่ามี Resistant mutant strain เกิดขึ้นหรือไม่ กล่าวคือ ถ้าบริเวณใสเกิดมีโคโลนีของเชื้อทดสอบเจริญอยู่ได้แสดงว่าโคโลนีเหล่านั้นเป็น Resistant mutant ซึ่งไม่ถูกยับยั้งด้วยส่วนน้ำใส สำหรับผลของการยับยั้งเชื้อทดสอบโดย *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จะเห็นได้ว่ามีความหลากหลายมาก ตัวอย่างเช่น การยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และ *Pasteurella multocida* ของ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ CU.1และ CU. 4 ถึงแม้จะเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน คือ *Lactobacillus acidophilus* แต่ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบต่างกัน (ตารางที่ 4.1) แสดงว่าเชื้อ CU.1 และ CU.4 เป็นสายพันธุ์ที่ต่างกัน เมื่อพิจารณาภาพโดยรวมๆ จะเห็นได้ว่าไม่ว่าจะเป็นความกว้างของบริเวณยับยั้งความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบแต่ละชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ทั้ง 6 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกัน แสดงว่าสารต่อต้านจุลชีพที่ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 6สายพันธุ์สร้างขึ้นนี้อาจจะเป็นสารต่อต้านจุลชีพต่างชนิดกันจึงให้ผลการยับยั้งที่แตกต่างกัน เนื่องจากสารต่อต้านจุลชีพแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะกับบริเวณที่รับแบคเทอริโอซินแตกต่างกัน,กลไกการออกฤทธิ์ก็แตกต่างกันด้วย ดังนั้น ควรที่จะได้มีการนำเอา *Lactobacillus* spp. ทั้ง 6 สายพันธุ์ไปทำการศึกษาและสกัดสารต่อต้านจุลชีพไปทำให้บริสุทธิ์เพื่อศึกษาโครงสร้างของโมเลกุลและกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบทางด้านเภสัชวิทยาต่อไป ซึ่งในอนาคตมีความเป็นไปได้ที่จะนำเอาสารต่อต้านจุลชีพที่ผลิตได้จาก *Lactobacillus* spp. 6 สายพันธุ์นี้ไปสกัดทำเป็นสารปฏิชีวนะต่อไป เนื่องจากสารต่อต้านจุลชีพของ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 6 สายพันธุ์นี้ให้ผลในการออกฤทธิ์ต่อเชื้อก่อโรคค่อนข้างกว้าง ซึ่งเชื้อเหล่านี้สามารถก่อโรคในคน

การทดสอบสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อ ล.อ.บ. ที่คัดเลือกได้เบื้องต้นตามหลักของ Bergey' s Manual of Systemic Bacteriology ปรากฏว่าเชื้อ ล.อ.บ. ทั้ง 6 สายพันธุ์ เป็นเชื้อในสกุล *Lactobacillus* ซึ่งก็สอดคล้องกับรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่าเป็นแกรมบวกรูปร่างเป็นท่อน และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆการใช้คาร์โบไฮเดรทชนิดต่างๆ พบว่า ล.อ.บ. ที่แยกได้สามารถจัดชนิดเป็น *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus casei subsp. tolerance, Lactobacillus jensenii* และส่วนใหญ่ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จะเป็นพวก Homofermentative Lactic Acid Bacteria(Buchanan,1974)ผลของการจัดจำแนกชนิดของเชื้อที่กล่าวมาข้างต้นนี้น่าจะมีความถูกต้องเพราะได้เคยมีรายงานถึงการพบเชื้อ *Lactobacillus* spp. พวกนี้ในลำไส้ของไก่

(Gilliland,1975) แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้มั่นใจว่าเชื้อ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่จัดจำแนกชนิดนั้นมีความถูกต้องยิ่งขึ้น ควรจะได้มีการหาปริมาณของ G+C แล้วเทียบกับค่ามาตรฐานของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย แต่ละชนิด ตามหนังสือ Bergey's manual เพื่อความถูกต้องชัดเจนยิ่งขึ้น

การทดสอบความสามารถในการทนเกลือแกงและเกลือน้ำดีของเชื้อ *Lactobacillus* spp. 6 สายพันธุ์ ที่แยกได้ปรากฏว่าสามารถทนต่อสภาวะความเข้มข้นที่น่าพอใจในระดับหนึ่งซึ่งธรรมชาติของเกลือๆ จะเป็นสารช่วยลดความชื้น หรือ Water Activity ช่วยในการดึงน้ำออกจากเซลล์อันเนื่องจาก Osmotic Pressure ทำให้เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำอย่างรุนแรงและหยุดการเจริญ ดังนั้นเกลือที่เข้มข้นมาก ๆ จึงมีความเป็นพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์โดยตรงนอกจากนี้เกลือยังช่วยลดการแพร่หรือแทรกซึมของออกซิเจนทำให้จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศใช้ได้ยากและเกลือยังสามารถทำลายเอนไซม์บางชนิดเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นสูงพอที่จะทำลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์นั้นทำให้เอนไซม์เสียสมบัติ จุลินทรีย์จึงหยุดการเจริญเติบโต *Lactobacillus* spp. เป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่งซึ่งมีความสามารถในการทนเกลือได้เป็นอย่างดี Sandine,1979 ได้รายงานว่าแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำนม เช่น *Streptococcus cremoris* และ *Leuconostoc spp.* ทนเกลือไม่ดี ส่วนพวก *Str. lactis, L. casei* และ *L. plantarum*สามรถทนเกลือได้สูงถึง 6.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับเชื้อ *Lactobacillus* spp. ทั้ง6 สายพันธุ์ที่แยกได้จากลำไส้ไก่นั้นมีความสามารถในการทนความเข้มข้นของเกลือแกงได้ดี ซึ่งสมบัตินี้จะเป็นประโยชน์มาก กล่าวคือ โดยปกติในอาหารสัตว์จะมีการผสมเกลือลงไปเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลชีพ ดังนั้น *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้และสามารถทนเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นเกลือได้มากจะมีประโยชน์ช่วยให้ *Lactobacillus* spp. สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ และอีกประการ คือเมื่อ *Lactobacillus* spp. เหล่านั้นถูกกินเข้าไปสภาวะภายในระบบทางเดินอาหารของไก่จะมีภาวะ Osmotic Pressure สูงกว่าปกติ (Fuller, 1962) ดังนั้นการที่ *Lactobacillus* spp. สามารถทนเกลือได้สูงจะช่วยให้ *Lactobacillus* spp. สามารถมีชีวิตอยู่รอดและไปเพิ่มจำนวนในลำไส้ได้ ส่วนสมบัติการทนต่อเกลือน้ำดีก็เช่นกัน ภาวะในลำไส้จะมีน้ำดีจากตับอ่อนหลั่งออกมา เพื่อเป็นตัวทำให้ไขมันแตกตัวแล้วเอนไซม์ไลเปสจึงจะทำงานต่อได้ แน่นอน *Lactobacillus* spp. ต้องสัมผัสกับเกลือน้ำดียิ่งถ้า *Lactobacillus* spp. สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูงๆ แล้วจะทำให้ *Lactobacillus* spp. มีแนวโน้มว่าจะสามารถอยู่รอดได้ในลำไส้ของไก่ได้ ส่วนผลของ pH ในกระเพาะไก่จะอยู่ที่ระดับ 4.2-5.1 ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย pH จะประมาณ 3-4 *Lactobacillus* spp. สามารถอยู่รอดได้โดยไม่มีปัญหาในเรื่องของความเป็นกรด-ด่าง ในกระเพาะอาหารของไก่ (Fuller, 1962)

ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการแยก *Lactobacillus* spp. ที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นจากลำไส้ไก่ที่มีสุขภาพแข็งแรงมาเตรียมเป็นโพรไบโอติกเนื่องจาก *Lactobacillus* spp. มีความสำคัญดังนี้คือ ขณะที่ *Lactobacillus* spp. อยู่ในลำไส้ไก่จะให้การป้องกันโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารและรักษาสมดุลย์ทั้งชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆได้มีการศึกษาและคัดเลือก *Lactobacillus* spp. โดยพิจารณาสมบัติหลายประการด้วยกันและการที่จะได้รับผลสำเร็จนั้นจะต้องใช้จุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นของระบบทางเดินอาหารของไก่เอง ลักษณะพิเศษของ *Lactobacillus* spp. ที่จะนำมาใช้ต้องมีความสามารถทนทานต่อน้ำย่อยและกรดต่างๆในทางเดินอาหารซึ่งมีผลต่อการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อ โดยเฉพาะต้องทนกรดในกระเพาะที่มีค่าpHต่ำระหว่าง4.2-5.1 และทนต่อน้ำดีของตับอ่อนที่บริเวณลำไส้เล็กซึ่งมีpHสูงระหว่าง 6.2-8.0 อีกด้วยเพราะการให้ไก่กิน *Lactobacillus* spp. เชื้อต้องผ่านกระเพาะอาหารไปเกาะแล้วเจริญในลำไส้ (Fuller, 1962)

การทดสอบความสามารถของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้ทั้ง 6 สายพันธุ์ เพื่อดูการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารของไก่จริงๆ (in vivo) ซึ่งการทดสอบนี้เป็นการทดสอบเบื้องต้นว่าควรจะให้ Lactobacillus ในจำนวนเท่าใดและจะใช้วิธีการใดในการให้ไก่กิน *Lactobacillus* spp. โดยที่การทดลองนี้ให้กิน *Lactobacillus* spp. ทั้ง 6 สายพันธุ์ แบบผสม (Mixed Culture) แทนที่จะแยกให้กินแต่ละสายพันธุ์ แล้วนามาเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 6 สายพันธุ์รวมกันเพราะความจำกัดในเรื่องจำนวนไก่ที่ได้รับในการทดลองแต่ได้มีการทดลองในห้องปฏิบัติการเพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อแต่ละสายพันธุ์ไม่มีการผลิตสารต่อต้านจุลชีพยับยั้งการเจริญซึ่งกันและกัน ดังนั้นจึงทำการทดลองในรูปแบบผสม และจากการทดลองพบว่า *Lactobacillus* spp. 6 สายพันธุ์ที่ใช้มีอยู่ 1 สายพันธุ์ คือ CU. 3 ไม่สามารถตรวจพบ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์นี้ได้ในการทำ Total viable cell count ซึ่งอาจเป็นเพราะสายพันธุ์ CU. 3 นี้ไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดในลำไส้ไก่ซึ่งอาจมีเหตุผลเนื่องมาจาก *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์CU.3 เจริญเติบโตได้ช้ากว่าล.อ.บ.สายพันธุ์อื่นๆจึงไม่สามารถแข่งขันในการที่จะยึดเกาะกับผนังลำไส้ไก่จึงถูกระบบขับถ่ายของไก่ขับทิ้งออกมากับอุจจาระ หรือเป็นเพราะ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ CU. 3 นี้จำเพาะกับไก่แต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นมันจึงไม่สามารถยึดเกาะกับผนังลำไส้ไก่พันธุ์ที่เราใช้ทดลอง (Fuller, 1974) เมื่อนำผลของการทำ Total viable cell count ของแต่ละกลุ่มทดสอบมาพิจารณาในเรื่องของแบทีเรียประจำถิ่น พบว่าเมื่อไก่มีอายุมากขึ้นจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่นที่ได้รับจากธรรมชาติก็จะมากขึ้นตามไปด้วยเนื่องจากไก่ได้รับเชื้อพวกนี้จากสิ่งแวดล้อมที่สัมผัสไม่ว่าจะเป็นอาหารที่กิน, น้ำ เป็นต้น ส่วนในเรื่องจำนวนของ *Lactobacillus* spp. ที่ได้จากการทำ Total viable cell count เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มทดสอบทั้ง 6 กลุ่ม พบว่า จำนวนของ *Lactobacillus* spp. จะขึ้นกับ

จำนวนของ *Lactobacillus* spp. ที่ไก่ได้รับตลอดจนความถี่ในการได้รับเชื้อเมื่อเวลาผ่านไปจำนวนของ *Lactobacillus* spp. ในระบบทางเดินอาหารของไก่จะค่อยๆ มีจำนวนสูงขึ้น เมื่อสิ้นสุดวันที่ 19 ของการเลี้ยงจะพบว่า กลุ่มทดสอบที่ 3, 4, 5, 6 (การทดลองที่ 4.8, ตารางที่ 4.8, รูปที่ 4.13-4.16) มีจำนวน *Lactobacillus* spp. ใกล้เคียงกัน จึงตัดสินใจที่จะใช้การให้ *Lactobacillus* spp. ในกลุ่มทดสอบที่ 3 มาเป็นตัวแทนในการศึกษาต่อไป เพราะเนื่องจากกลุ่มทดสอบที่ 3 เป็นกลุ่มที่ให้ *Lactobacillus* spp. แบบผสมทุก 3 วัน ส่วนกลุ่มทดสอบที่ 4, 5, 6 ถึงแม้จะให้ผลดีพอๆ กับกลุ่มทดสอบที่ 3 แต่เนื่องจากต้องให้กินทุกวันจึงไม่สะดวก เพราะเป็นการสิ้นเปลืองเวลาและผลที่ได้ก็ใกล้เคียงกับการที่ให้ *Lactobacillus* spp. แบบผสมทุกๆ 3 วัน จึงตัดสินใจเลือกใช้กลุ่มทดสอบ 3 ในการศึกษาต่อไป เมื่อพิจารณารูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศ์อิเลคตรอนแบบส่องกราดของกลุ่มควบคุมที่ไม่ให้กิน *Lactobacillus* spp. กับกลุ่มทดสอบต่างๆ ที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. จะพบว่ากลุ่มทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. จะพบเชื้อส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นแท่ง ซึ่งน่าจะเป็น *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ให้กินเนื่องจากสามารถยืนยันได้จากการตรวจนับจำนวนของ *Lactobacillus* spp. และแยกชนิดเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ได้ *Lactobacillus* spp. กลับมาจำนวน 5 สายพันธุ์ ส่วนกลุ่มควบคุมจะพบเชื้อรูปร่างหลากหลาย มีทั้งรูปร่างที่เป็นแท่ง, กลม ซึ่งน่าจะเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่ไก่ได้รับจากสิ่งแวดล้อมและเมื่อพิจารณาจากรูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดความหนาแน่นของเชื้อจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น เมื่อเวลาผ่านไปไม่ว่าจะเป็นกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มทดสอบซึ่งสอดคล้องกับผลของการทำ Total viable cell count

ผลการทดลองเบื้องต้นเพื่อดูผลของโพรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของไก่ทั้ง 2 กลุ่ม (การทดลองที่ 4.9, ตารางที่ 4.10-4.12, รูปที่ 4.17-4.20) เมื่อให้กินเชื้อในกลุ่มทดสอบ 3 กับกลุ่มควบคุม เมื่อสิ้นสุดการทดลองเปรียบเทียบกัน พบว่า ไก่กลุ่มที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสมให้น้ำหนักมากกว่าไก่กลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ยังไม่สามารถบอกได้อย่างแน่ชัดว่าการให้ *Lactobacillus* spp. จะมีผลทำให้ไก่มีน้ำหนักมากกว่าไก่กลุ่มควบคุมเนื่องจากจำนวนของไก่ที่ใช้ในการทดลองน้อยเกินไปเนื่องจากสถานที่ๆ ใช้ในการทดลองเป็นระดับฟาร์มทดลองมีความจำกัดในด้านพื้นที่ๆใช้เลี้ยงจึงไม่สามารถนำไก่มาทดลองเป็นจำนวนมากๆได้ถ้าจะยืนยันผลการทดลองนี้ควรจะทดลองในระดับอุตสาหกรรมต่อไปซึ่งต้องใช้จำนวนไก่มากแต่จะทำให้ได้น้ำหนักโดยเฉลี่ยที่แน่นอนกว่านี้และเมื่อพิจารณาผลการตรวจนับจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่นและ *Lactobacillus* spp. ก็พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองแรก คือ กลุ่มควบคุมในวันแรกๆของการเลี้ยงเมื่อนำมาทำ Total viable cell count จะพบเชื้อจำนวนน้อยซึ่งสอดคล้องกับรูปกล้องอิเลคตรอนแบบส่องกราดเมื่อเวลาผ่านไปจะค่อยๆพบแบคทีเรีย

ประจำถิ่นซึ่งไก่ได้รับจากธรรมชาติเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ และไก่กลุ่มทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. จะพบจำนวนของ *Lactobacillus* spp. เพิ่มขึ้นเรื่อยๆเมื่อเวลาผ่านไปโดยที่จะพบชนิดของ *Lactobacillus* spp. 5 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับการทดลองแรกในด้านของการถ่ายภาพจากกล้องอิเลคตรอนพบว่าไก่กลุ่มควบคุมพบรูปร่างของเชื้อหลากหลายเข้าใจว่าเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่ไก่ได้รับจากธรรมชาติ ส่วนไก่กลุ่มทดสอบพบว่ารูปร่างของแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นแท่ง น่าจะเป็น *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ให้ไก่กิน ยืนยันได้จากผลการทำ Total viable cell count ของ *Lactobacillus* spp. ผลพลอยได้ของไก่ที่ได้รับ *Lactobacillus* spp. คือ สามารถป้องกันการเกิดโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร ซึ่งจากผลการทดลองตารางที่ 1 ได้แสดงให้เห็นแล้วว่า *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้นั้นสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของไก่ได้ซึ่งสารที่สร้างขึ้นนี้มีผู้ให้ชื่อต่างๆ ตัวอย่างเช่น Acidophilin, Lactocidin และ อื่นๆ (Tortuero , 1973) นอกจากนี้ยังพบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตขึ้นก็สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ส่วนกรดแลคติกที่ *Lactobacillus* spp. ผลิตขึ้นนี้จะทำให้ลำไส้มีสภาวะเป็นกรด ซึ่งจะช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้อีกด้วย ดังนั้นพอจะสรุปได้ว่า*Lactobacillus* spp. ที่เหมาะสมในการนำมาใช้เสริมลงในอาหารไก่ควรเป็น *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ CU.1,2,4,5,6 *Lactobacillus* spp. สามารถช่วยให้อัตราการเจริญเติบโตดีกว่าไก่กลุ่มควบคุมและประสิทธิภาพการใช้อาหารมีแนวโน้มที่ดีกว่าไก่กลุ่มควบคุมอาจเนื่องมาจากกรดแลคติกทำให้ pH ในลำไส้ลดลงซึ่งสภาวะที่เป็นกรดนี้จะช่วยให้การดูดซึมสารอาหารบางตัวดีขึ้นและกรดแลคติกยังช่วยในการดูดซึมแคลเซี่ยม และให้พลังงานแก่ไก่ได้อีกด้วย ส่วนเชื้อ *Lactobacillus* spp. เองจะสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ ทำให้ขบวนการคาทาโบลิซึมของกรดอะมิโนลดลงซึ่งก็จะทำให้ปริมาณแอมีนลดลงด้วยทำให้สัตว์มีระบบการทำงานของลำไส้ดีขึ้นและสามารถดูดซึมกรดอะมิโนไปใช้ได้แทนที่จะถูกจุลินทรีย์ใช้ในขบวนการคาทาโบลิสมจึงทำให้ไก่กลุ่มทดสอบมีแนวโน้มของประสิทธิภาพการใช้อาหารดีกว่าไก่กลุ่มควบคุมและเหตุผลอีกประการหนึ่งอาจเนื่องมาจาก *Lactobacillus* spp. สามารถสร้างสาร Unidentified Growth Factor (UGF) ขึ้นในลำไส้ไก่ทำให้มีผลช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่ให้ดีขึ้น(Shirota, 1962)

การทดสอบความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อ *Salmonella typhimurium* ของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้การทดสอบนี้ทำเพื่อต้องการดูผลของการยับยั้งเชื้อทดสอบในห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 4.1) กับในลำไส้ไก่โดยตรงว่าจะให้ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีเหมือนกับการทดลองในห้องปฏิบัติการหรือไม่ ซึ่งจากการทดลองพบว่าเมื่อให้กิน *Lactobacillus* spp. พร้อมๆ กับ *Salmonella typhimurium* (กลุ่มทดสอบ P_3/S) ในวันแรกของการเลี้ยงจะเกิดการแข่ง

ขันการยึดเกาะกับผนังลำไส้ไก่เกิดขึ้นเพราะว่าในไก่แรกเกิดแบคทีเรียประจำถิ่นยังมีไม่มากนัก และเมื่อนำมาทำ Total viable cell count ในวันที่ 5 ของการเลี้ยง ปรากฏว่า พบทั้งเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *Salmonella typhimurium* เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่แบคทีเรียทั้งสองชนิดอยู่ในระหว่างการเจริญเติบโต (log phase) การสร้างสารต่อต้านจุลชีพชนิดอื่นของ *Lactobacillus* spp. ยังไม่เกิด และจากการที่พบเชื้อ *Salmonella typhimurium* เป็นการยืนยันว่าปริมาณเชื้อ *Salmonella typhimurium* ที่ให้ตาม LD_{50}ของหนูเป็นปริมาณที่ค่อนข้างเหมาะสมเนื่องจากถ้าให้ปริมาณ *Salmonella typhimurium* น้อยไปเชื้อจะไม่สามารถผ่านสภาวะของระบบทางเดินอาหารไปยึดเกาะกับผนังลำไส้ไก่ และเมื่อนำลำไส้ไก่ที่10 วันของการเลี้ยงมาทำ Total viable cell count ปรากฏว่าไก่กลุ่ม P_0/S ไม่พบ *Salmonella typhimurium* แสดงว่าเชื้อ Salmonella ถูกทำให้มีจำนวนลดลงซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการที่ *Lactobacillus* spp. สามารถสร้างกรดแลคติกและสารต่อต้านจุลชีพมายับยั้งการเจริญของ*Salmonella typhimurium* (Brownell, 1969) ซึ่งจะตรงข้ามกับกลุ่มทดสอบ S/H_2O ซึ่งเมื่อนำลำไส้ไก่มาทำ Total viable cell count ตรวจหาจำนวนของ *Salmonella typhimurium* ปรากฏว่า ยังคงพบเชื้อ *Salmonella typhimurium* คงอยู่ตลอด 25 วันของการทดลอง ทำให้ไก่กลุ่มทดสอบ S/H_2O นี้เป็นแหล่งสะสมของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ส่วนกลุ่มทดสอบ P_3/S, P_6/S , และ P_{12}/S พบแต่ *Lactobacillus* spp. โดยที่ไม่พบเชื้อ *Salmonella typhimurium* อาจเป็นเพราะ *Lactobacillus* spp. กลายเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น เมื่อเชื้อ *Salmonella typhimurium* เข้าไปถึงลำไส้ไก่ก็จะไม่มีที่ยึดเกาะเพราะทั้งลำไส้ไก่จะเต็มไปด้วย *Lactobacillus* spp. และ *Salmonella typhimurium* ยังต้องพบกับภาวะการเป็นกรดซึ่งเกิดจากกรดแลคติก ซึ่ง *Lactobacillus* spp. สร้างขึ้นหรือสารต่อต้านจุลชีพที่ *Lactobacillus* spp. สร้างขึ้นมาจึงทำให้ *Salmonella typhimurium* ไม่สามารถเจริญอยู่ได้ในลำไส้ไก่ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Brownell, 1969 ที่พบว่าการดื่ม Acidophilus milk ซึ่งผลิตโดยใช้ *L. acidophilus* เป็นประจำทุกวันจะช่วยลดระยะเวลาการเป็นพาหะของโรคติดเชื้อ *Salmonella typhimurium*และเมื่อเปรียบเทียบผลการทดสอบโพรไบโอติกต่อการต้านทานการติดเชื้อ *Salmonella typhimurium* ในไก่ที่ได้จากการวิจัยนี้กับรายงานของ Brownell, 1969 พบว่าให้ผลดีในการลดจำนวนของเชื้อ *Salmonella typhimurium* ใกล้เคียงกัน จากเหตุผลที่กล่าวมาทั้งหมดนี้พอจะสรุปถึงการให้ไก่ได้รับเชื้อ *Lactobacillus* spp. ตั้งแต่แรกเกิดเพื่อให้ *Lactobacillus* spp. กลายเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นของไก่และค่อยๆเพิ่มจำนวนในไก่ทำให้ลำไส้ไก่อุดมไปด้วย *Lactobacillus* spp. แบบผสม ลูกไก่มีโอกาสติดเชื้อยากขึ้นและโตดีขึ้น ถ้าลูกไก่นั้นมี *Lactobacillus* spp. ที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคโดย *Lactobacillus* spp. จะเจริญตั้งรกรากอยู่ในทางเดินอาหารของลูกไก่แรกเกิดก่อนแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ทำให้แบคทีเรียที่เป็นเชื้อก่อ

โรคไม่สามารถเจริญเติบโตได้จึงไม่สามารถทำอันตรายต่อลูกไก่ได้ผลที่เกิดขึ้นคือไก่จะเจริญเติบโตดี ส่วนผลการทดสอบ P/H_2O ปรากฏว่าได้ผล Total viable cell count ของ *Lactobacillus* spp. เมื่อเปรียบเทียบกับการให้กินเชื้อโดยตรงเป็นที่น่าพอใจแสดงว่า *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่แยกได้นี้ทนต่อสภาวะแวดล้อมในธรรมชาติได้ดี จึงเหมาะกับการนำเชื้อ *Lactobacillus* spp. แบบผสมไปทำเป็นรูปเชื้อผงแห้งในเชิงพาณิชย์ให้เกษตรกรที่เลี้ยงไก่สามารถนำไปใช้ได้ง่ายและยังมีผลในการป้องกันโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารของไก่แต่อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ยังไม่มีความชัดเจนเพียงพอ กล่าวคือ ไม่สามารถที่จะจัดกลุ่มทดสอบได้มากกว่านี้ เนื่องจากไก่มีจำนวนจำกัด ตัวอย่างเช่น ควรจะได้มีการแบ่งไก่เป็นกลุ่ม ๆ โดยให้กินเชื้อ *Salmonella typhimuriun* ขนาดต่างๆกันและใช้ชนิดของเชื้อก่อโรคให้มากชนิดยิ่งขึ้น เพื่อที่จะได้สามารถบอกได้ชัดเจนมากขึ้นว่า *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้นี้ให้ผลการทดลองในไก่ดี เหมือนกับผลที่ได้จากห้องปฏิบัติการ

จากผลการทดลองที่กล่าวมาแล้วทั้งหมดนี้สามารถจะกล่าวได้ว่า *Lactobacillus* spp. ทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากไก่นี้มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดี เนื่องจากมีสมบัติตรงตามตารางที่ 2.1 คือ ต้องเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นของระบบทางเดินอาหารของไก่เอง,ทนสภาวะต่างๆของระบบทางเดินอาหารได้ดีและสามารถผลิตสารต่อต้านจุลชีพที่ก่อให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารของไก่ได้ซึ่งจะช่วยให้เกิดความสมดุลย์ของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารดังนั้นการเสริมโพรไบโอติก (*Lactobacillus* spp. แบบผสม) จึงมีประโยชน์ทำให้สมรรถภาพในการผลิตของไก่ดีขึ้นซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารปฏิชีวนะในการเร่งการเจริญเติบโตโดยจะเห็นได้จากการเสริมสารเร่งการเจริญเติบโตจำเป็นต้องเสริมลงในอาหารให้ไก่กินตลอดเวลาแต่การใช้ *Lactobacillus* spp. แบบผสมอาจให้ในระยะเวลาสั้นๆได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของ *Lactobacillus* spp. , ปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิต,วิธีการให้,นอกจากนี้ในประเทศไทยการเสริมสารปฏิชีวนะในอาหารไก่จะให้ไก่กินตลอดเวลาไม่มีระยะงดให้ก่อนชำแหละโดยจะเห็นได้จากประกาศของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ฉบับที่ 1 ปี 2526 ซึ่งออกตามพระราชบัญญัติควบคุมอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 ยังไม่สามารถบังคับหรือควบคุมการใช้สารปฏิชีวนะให้ถูกต้องตามคำแนะนำได้อันตรายจึงตกกับผู้บริโภคดังนั้นโพรไบโอติก (*Lactobacillus* spp. แบบผสม)จึงอาจจะมีบทบาทสำคัญที่จะใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตแทนสารปฏิชีวนะได้ อย่างไรก็ตามผลของการใช้ โพรไบโอติก (*Lactobacillus* spp. แบบผสม) เพื่อเพิ่มสมรรถภาพของไก่นี้ หากจะสรุปให้แน่ชัดแล้วควรมีการศึกษาเพิ่มเติมและมีการทดลองให้กว้างขวางมากขึ้นต่อไป