บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

4.1.1 การแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากตัวอย่างลำไส้ไก่

ได้แยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากตัวอย่างลำไส้ไก่โดยซื้อจากตลาดสดแหล่งต่างๆในเขตกรุงเทพมหานคร เช่น ตลาดท่าพระ ตลาดเยาวราช ตลาดคลองเตย ตลาดหนองแขม ได้ลำไส้ไก่มาทั้งหมด 54 ตัวอย่าง แล้วนำมาทำการแยกหาแลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยการตัดเอาลำไส้ไก่ส่วนต่างๆ แล้วนำมาล้างด้วย 0.85% (น้ำหนัก/ปริมาตร) NSS ให้สะอาดจากนั้นจึงนำมาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS โดยมี 0.004 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) บรอมเครซิล เพอเพิล เป็นอินดิเคเตอร์ บ่มที่ 37°เซลเซียส 24 ชั่วโมง จึงนำมาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มที่ 37°เซลเซียส 24 ชั่วโมง สังเกตุโคโลนีที่มีสีเหลือง ใช้เข็มเขี่ยโคโลนีเหล่านั้นมาทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส ถ้าเป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะให้ผลการทดสอบเป็นลบ เก็บโคโลนีเหล่านี้ไว้ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°เซลเซียส เพื่อแนวโน้มใช้เป็นโพรไบโอติก จากผลการทดลองแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากลำไส้ไก่ที่มีสุขภาพแข็งแรงทั้งหมด 54 ตัวอย่างที่เก็บมาสามารถแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ได้ทั้งหมด 28 สายพันธุ์

4.2 การคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ

4.2.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บี เซช ไอ

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยมี *Staphylococcus aureus* เป็นตัวแทนของกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม *Listeria monocytogenes* เป็นตัวแทนของกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง และ *Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis , Pasteurella multocida, Bordetella avium, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa* เป็นตัวแทนของกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง จากวิธีการเปรียบเทียบความกว้างของ บริเวณใส (Clear Zone) ที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งเชื้อทดสอบในวุ้นเพาะเชื้อแข็ง บี เซช ไอ (Agar diffusion) โดยนำส่วนน้ำใสของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่แยกจากลำไส้ไก่ทั้งหมด 28 สายพันธุ์ มาทำการทดสอบ และวัดค่า pH พบว่าอยู่ในช่วง 3.3 - 4.0 จากนั้นนำส่วนใสมาปรับ pH ให้ได้ 6.5 โดยใช้ 1.0 N NaOH พบว่าส่วนน้ำใสของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกจากลำไส้ไก่จำนวน 6 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของไก่โดยเกิดบริเวณใสรอบๆ

หลุมที่หยอดด้วยส่วนน้ำใสของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่าเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์CU.1จะไม่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *Pasteurella multocida*,แลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ CU.2,3,4 จะไม่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, แลคติกแอซิดแบคทีเรีย สายพันธุ์ CU.5 จะไม่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *Bordetella avium, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa* ส่วนแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ CU.6 จะไม่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *Bordetella avium, Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa* และ *Salmonella typhimurium* (ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1- 4.6)

นั่นคือ จากผลการทดลองทำให้สามารถคัดเลือก *Lactobacillus* spp. แบบผสม เนื่องจากสามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพมาใช้เป็นโพรไบโอติกเสริมอาหารไก่

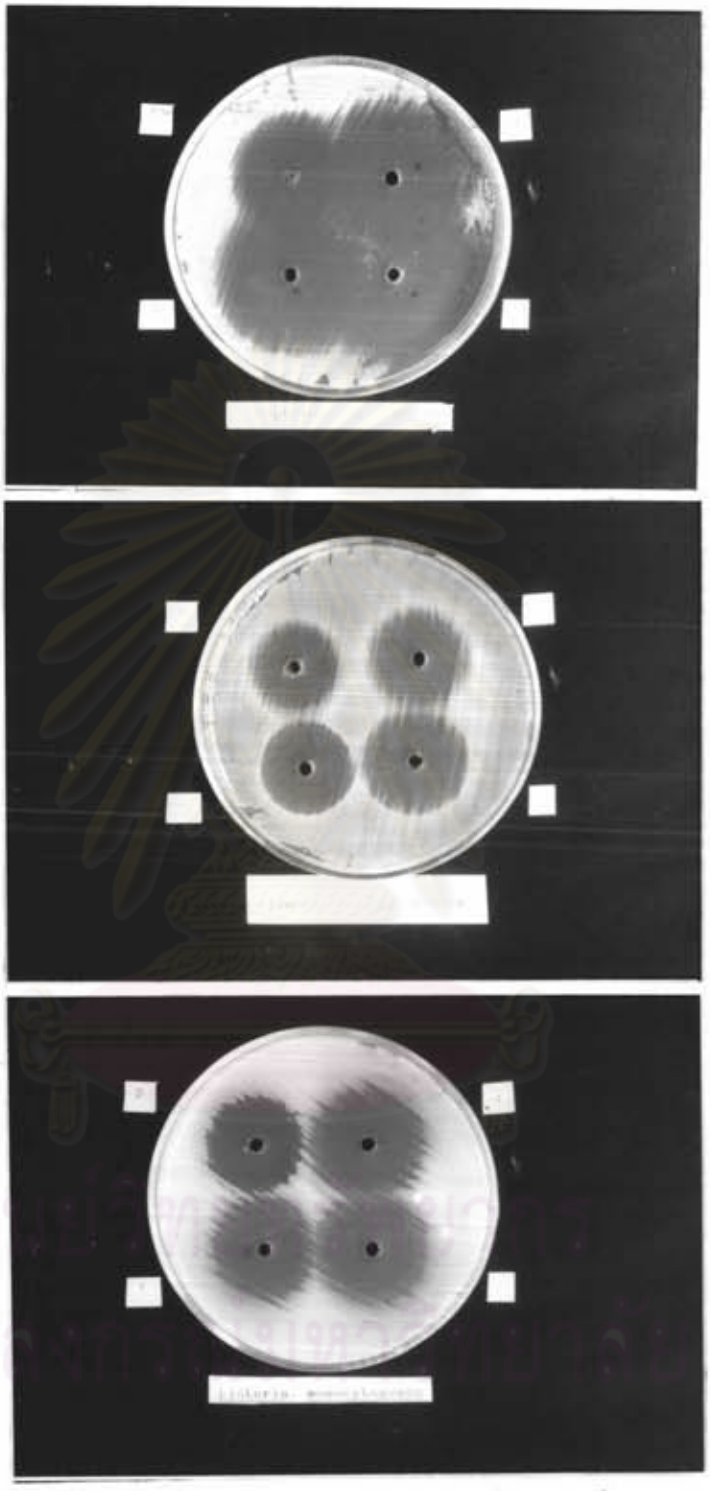
ตารางที่ 4.1 : ความกว้างของบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้

ส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ.ที่แยกได้	ความกว้างของบริเวณใส (มม.)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
CU. 1	14	28	0	25	12	14	21	38
CU. 2	17	25	26	28	0	26	28	42
CU. 3	18	24	14	30	0	28	25	28
CU. 4	20	30	27	35	0	18	30	35
CU. 5	0	26	10	0	0	22	26	27
CU. 6	0	24	12	0	0	8	0	20

1 = *Bordetella avium*
2 = *Listeria monocytogenes*
3 = *Pasteurella multocida*
4 = *Proteus vulgalis*
5 = *Pseudomonas aeruginosa*
6 = *Salmonella enteritidis*
7 = *Salmonella typhimurium*
8 = *Staphylococcus aureus*

CU.1 = *Lactobacillus acidophilus*
CU.2 = *Lactobacillus bulgaricus*
CU.3 = *Lactobacillus fermentum*
CU.4 = *Lactobacillus acidophilus*
CU.5 = *Lactobacillus casei* Subsp. *tolerans*
CU.6 = *Lactobacillus jensenii*

ภาวะการเลี้ยงเชื้อทดสอบ : อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียใช้ BHI Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°เซลเซียส 24 ชั่วโมง



ก

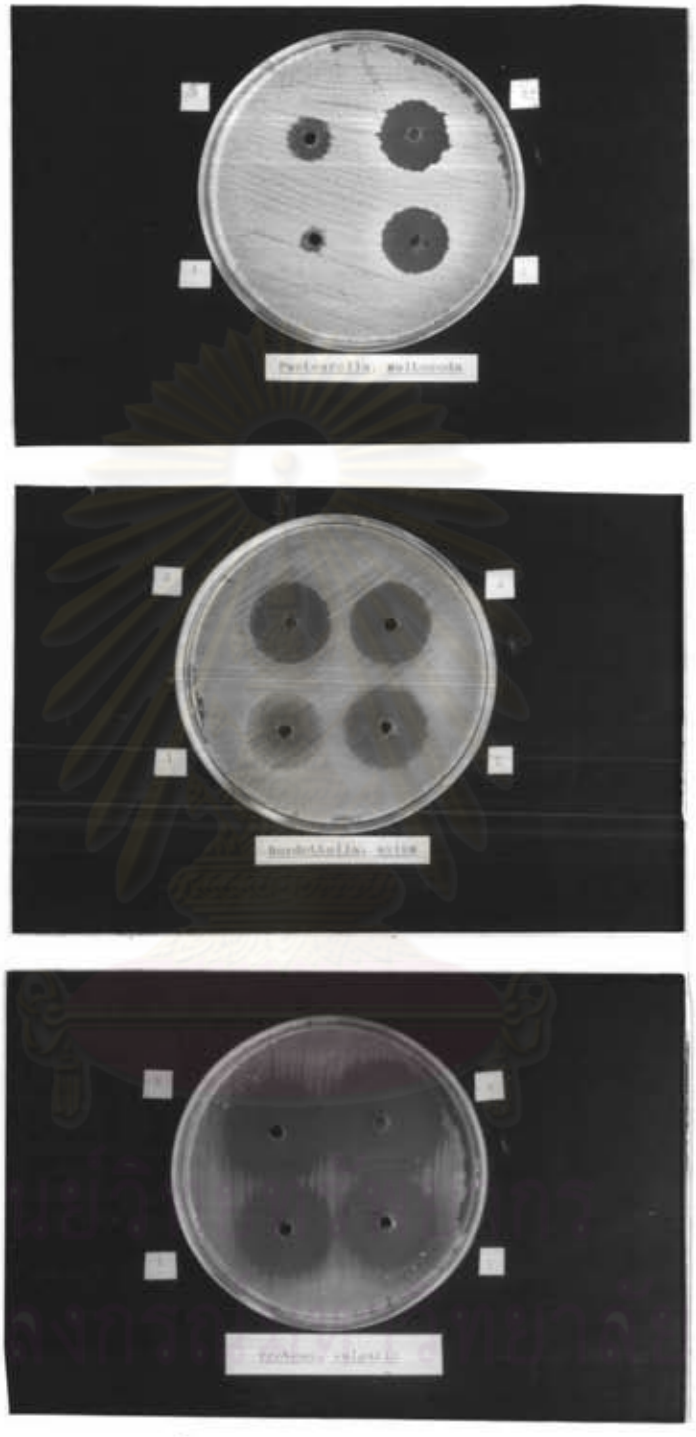
ข

ค

3 4

1 2

รูปที่ 4.1 การเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บี เซช ไอ ที่เกิดจากการยับยั้งด้วยส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ ที่แยกได้ 1.สายพันธุ์ CU.1 2.สายพันธุ์ CU.2 3.สายพันธุ์ CU.3 4.สายพันธุ์ CU.4 ต่อเชื้อทดสอบ ก. *Staphylococcus aureus* ข. *Salmonella typhimurium* ค. *Listeria monocytogenes* บ่มที่ 37°เซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง



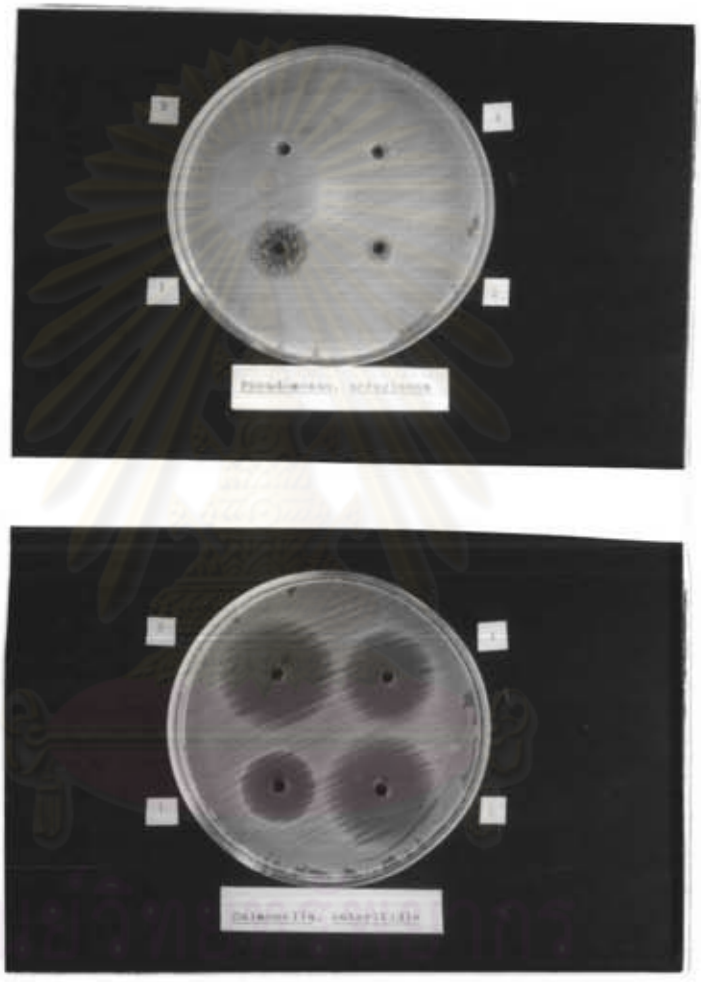
ง

จ

ฉ

3 4
1 2

รูปที่ 4.2 การเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บี เฮช ไอ ที่เกิดจากการยับยั้งด้วยส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ ที่แยกได้ 1.สายพันธุ์ CU.1 2.สายพันธุ์ CU.2 3.สายพันธุ์ CU.3 4.สายพันธุ์ CU.4 ต่อเชื้อทดสอบ ง. *Pasteurella multociola* จ. *Bordetella avium* ฉ. *Proteus vulgaris* บ่มที่ 37°เซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง



ช

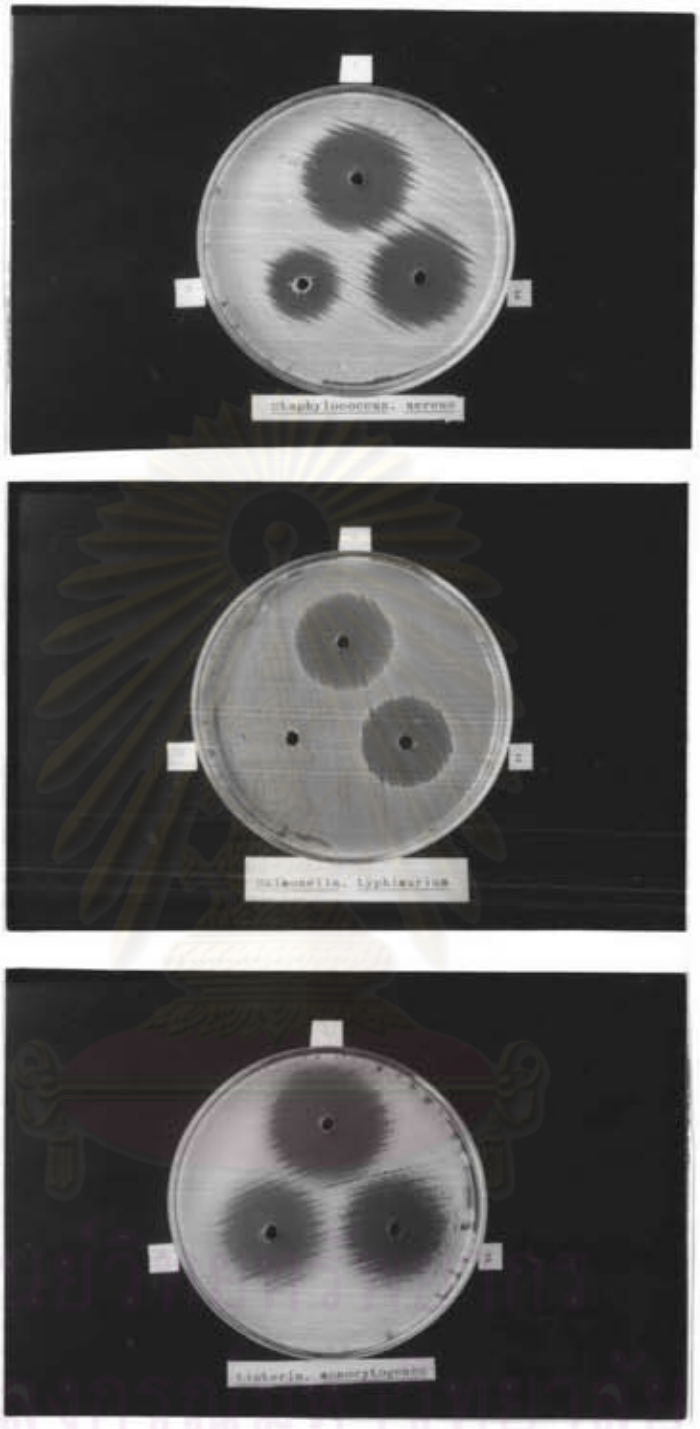
ช

3 4
1 2

รูปที่ 4.3 การเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บี เซช ไอ ที่เกิดจากการยับยั้งด้วยส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ ที่แยกได้ 1.สายพันธุ์ CU.1 2.สายพันธุ์ CU.2 3.สายพันธุ์ CU.3 4.สายพันธุ์ CU.4 ต่อเชื้อทดสอบ ช. *Pseudomonas aeruginosa* ช. *Salmonella enteritidis* บ่มที่ 37°เซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I18284826



ก

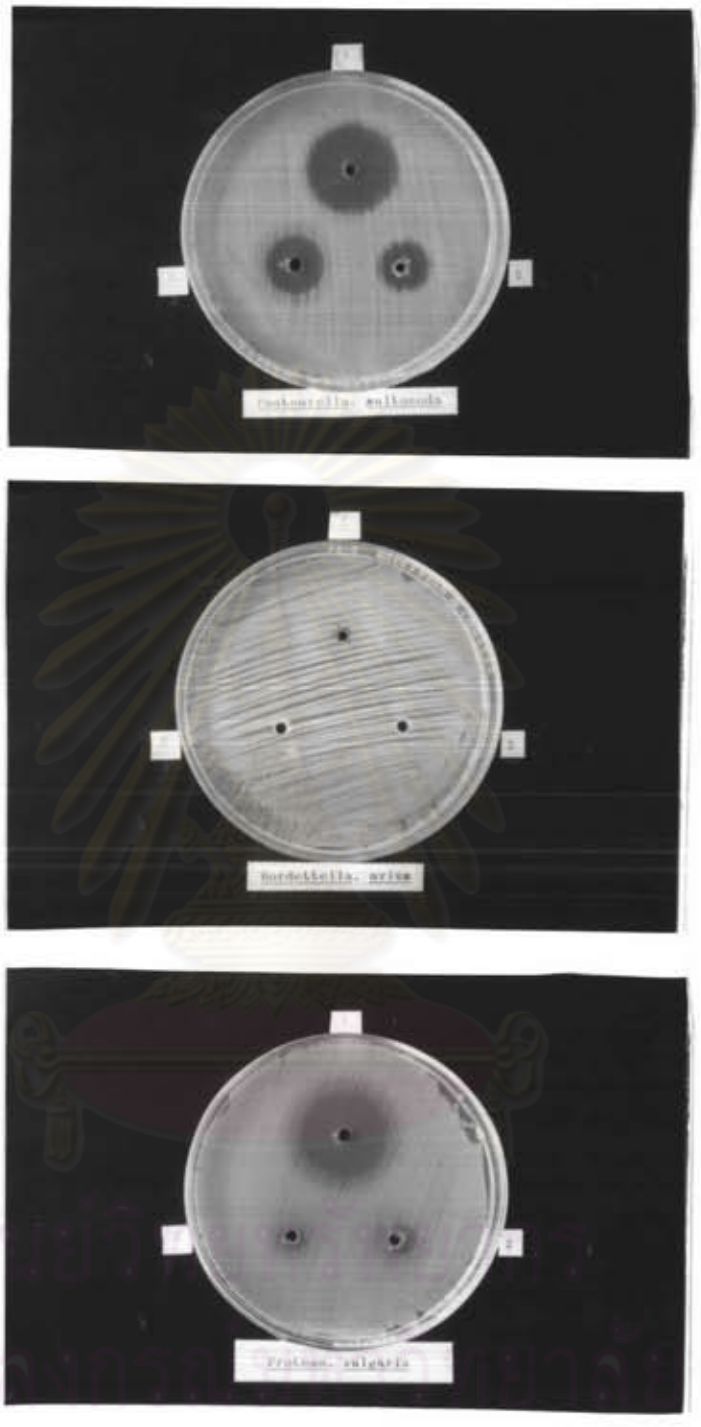
ข

ค

1

3 2

รูปที่ 4.4 การเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บี เซช ไอ ที่เกิดจากการยับยั้งด้วยส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ ที่แยกได้ 1. *L. casei* (Shirota) 2.สายพันธุ์ CU.5 3.สายพันธุ์ CU.6 ต่อเชื้อทดสอบ ก.*Staphylococcus aureus* ข. *Salmonella typhimurium* ค. *Listeria monocytogenes* บ่มที่ 37°เซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง



ง

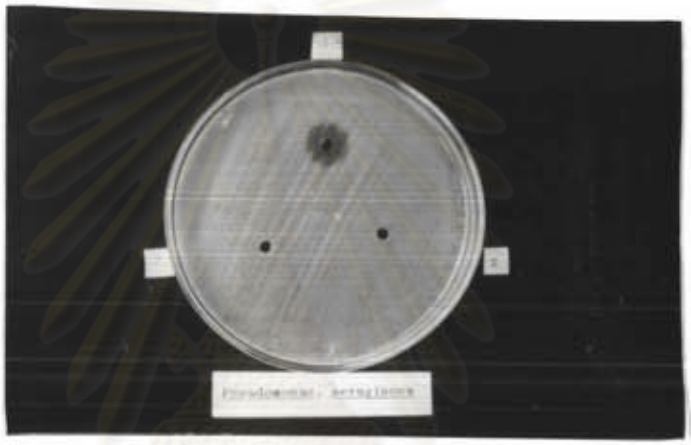
จ

ฉ

1

3 2

รูปที่ 4.5 การเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บี เฮช ไอ ที่เกิดจากการยับยั้งด้วยส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ ที่แยกได้ 1. *L. casei* (Shirota) 2.สายพันธุ์ CU.5 3. สายพันธุ์ CU.6 ต่อเชื้อทดสอบ ง. *Pasteurella multocida* จ. *Bordetella avium* ฉ. *Proteus vulgaris* บ่มที่ 37°เซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง



ช

1

3 2

รูปที่ 4.6 การเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บี เอช ไอ ที่เกิดจากการยับยั้งด้วยส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ ที่แยกได้ 1. *L. casei* (Shirota) 2.สายพันธุ์ CU.5 3. สายพันธุ์ CU.6 ต่อเชื้อทดสอบ ช. *Pseudomonas aeruginosa* บ่มที่ 37°เซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

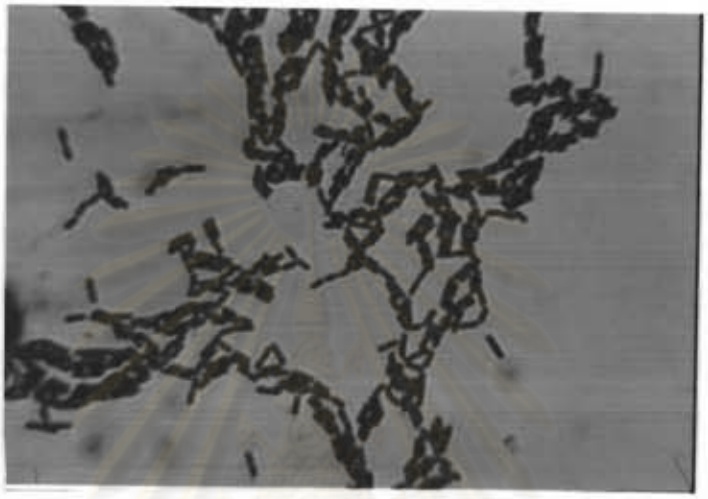
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การตรวจสอบชนิดของ ล.อ.บ. ที่แยกได้ทางอนุกรมวิธาน

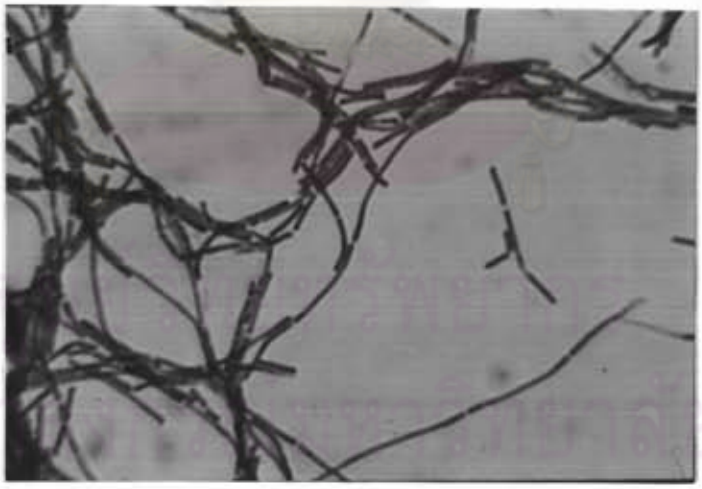
เมื่อนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 28 สายพันธุ์มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ (ตามข้อ 4.2.1)ปรากฏว่าได้เชื้อ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย 6 สายพันธุ์ ที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบ เราจะนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์มาศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะทางสันฐานวิทยา พบว่าลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจะมีโคโลนีขนาดเล็ก ขนาดกลาง ขอบโคโลนีเรียบและทึบแสงสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ในสภาพที่มีและไม่มีอากาศจัดเป็น microaerophile สร้างกรดจากน้ำตาลแลคโตส, ซูโคส เมื่อย้อมสีแกรมและตรวจดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะเห็นเซลล์ติดสีน้ำเงินของแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนลักษณะต่างๆ (ดังตัวอย่างในรูป 4.7 - 4.9) ทุกสายพันธุ์ไม่มีการสร้างสปอร์ และเมื่อทดสอบลักษณะทางชีวเคมีเพื่อดูการสร้างเอนไซม์คาตาเลส โดยใช้ *B. subtitis* เป็นตัวเปรียบเทียบในการให้ผลเป็นบวก เนื่องจากเชื้อ *B. subtitis* สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลสได้ในขณะที่เชื้อในกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จะไม่สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลส ซึ่งจากการทดลอง พบว่า เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง6 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากลำไส้ไก่ให้ผลการทดสอบคาตาเลสเป็นลบ

การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรทชนิดต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแลคโตแบซิลไลเอ็มอาร์เอสพื้นฐาน (ไม่มีการเติมสารสกัดจากเนื้อ และน้ำตาลกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ) โดยคาร์โบไฮเดรทที่ใช้ทดสอบมี 13 ชนิด (ภาคผนวก ค. หมายเลข 4.6) ให้ผลต่างๆที่เปรียบเทียบกับ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ต่างๆใน Bergey 's Manual of Systemic Bacteriology (Kandler และคณะ, 1986)โดยใช้เชื้อ *L. lactis* TISTR 452 (BANGKOK MIRCEN) เป็นสายพันธุ์อ้างอิงมาตรฐานในการทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรทชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าความน่าจะเป็นของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (ล.อ.บ.) ที่แยกได้จากลำไส้ไก่เป็นดังนี้

รหัส	แหล่งที่มา	ชื่อ - สกุลของเชื้อ
CU. 1,4	ตลาดสดคลองเตย	*Lactobacillus acidophilus*
CU. 2	ตลาดสดหนองแขม	*Lactobacillus bulgaricus*
CU. 3	ตลาดสดท่าพระ	*Lactobacillus fermentum*
CU. 5	ตลาดสดคลองเตย	*Lactobacillu casei* subsp. *tolerans*
CU. 6	ตลาดสดเยาวราช	*Lactobacillus jensenii*

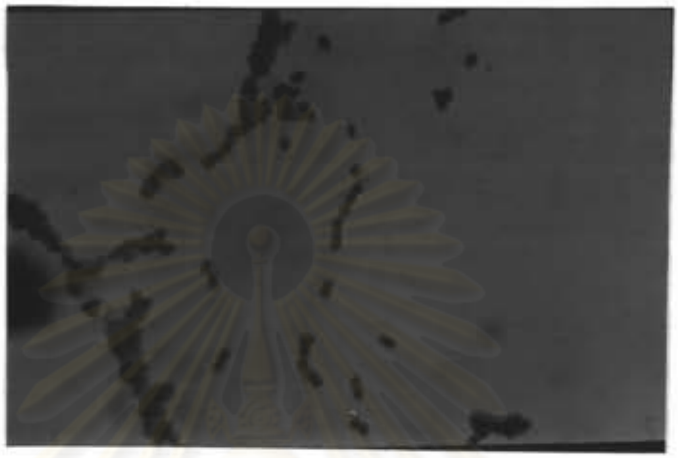


ก

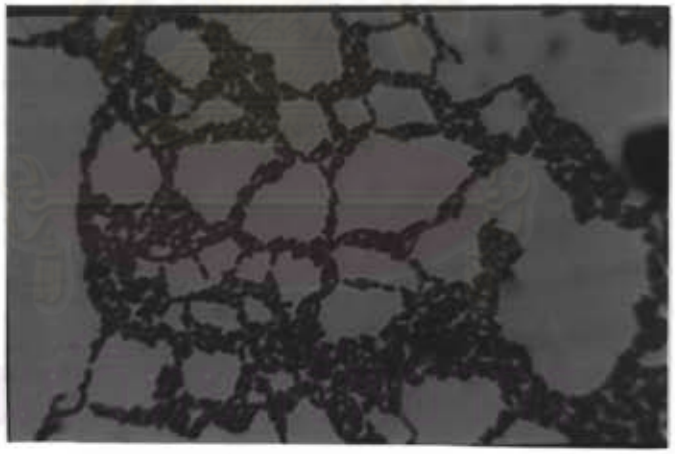


ข

รูปที่ 4.7 ภาพการย้อมสีแกรมบวกของ *Lactobacillus* spp. ก.สายพันธุ์ CU.1 ข.สายพันธุ์ CU.2 ที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 1,000 เท่า



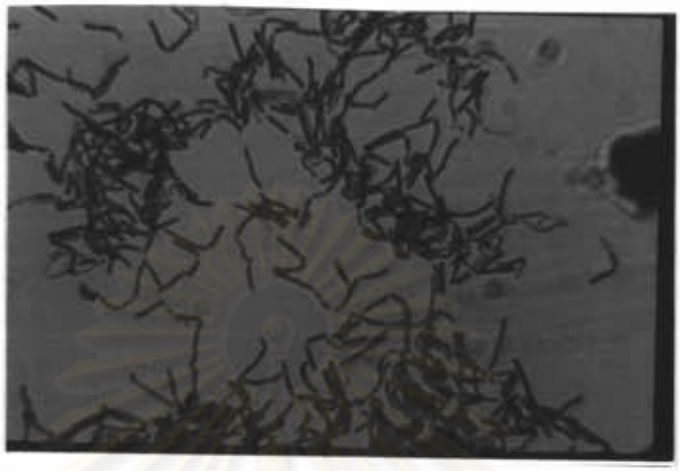
ค



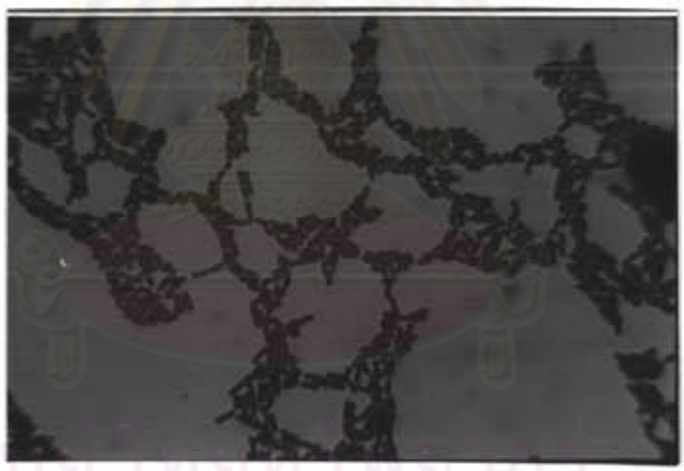
ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.8 ภาพการย้อมสีแกรมบวกของ *Lactobacillus* spp. ค.สายพันธุ์ CU.3 ง.สายพันธุ์ CU.4 ที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 1,000 เท่า



จ



ฉ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.9 ภาพการย้อมสีแกรมบวกของ *Lactobacillus* spp. จ.สายพันธุ์ CU.5 ฉ.สายพันธุ์ CU.6 ที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 1,000 เท่า

ตารางที่ 4.2 : การใช้คาร์โบไฮเดรทของ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ

เชื้อที่แยกได้ / Carbohydrate Reaction	L. lactis (TISTR452)	CU. 1	CU. 2	CU. 3	CU. 4	CU.5	CU. 6
Amydalin	-	+	-	-	+	-	+
Arabinose	-	-	-	+	-	-	-
Cellobiose	-	+	-	-	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+
Glucose (Acid)	+	+	+	+	+	+	+
Glucose (Gas)	-	-	-	+	-	-	-
Gluconate	-	+	-	+	+	+	-
Lactose	+	+	+	+	+	+	-
Maltose	+	+	-	+	+	-	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-
Mannose	+	+	-	+	+	+	+
Sucrose	+	+	-	w	+	-	+
Sorbital	-	-	-	-	-	+	-
Ribose	-	-	-	+	-	+	-
Esculin	w	+	-	-	+	-	+
Homofermentative	+	+	+	-	+	+	+
Heterofermentative	-	-	-	+	-	-	-

+ = Positive - = Negative w = Weak

หมายเหตุ : *L. lactis* (TISTR 452) ได้จาก BANGKOK MIRCEN ใช้เป็นเชื้ออ้างอิงเปรียบเทียบผลการทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรทตาม Bergey 's Manual 8th edition , 1974

CU. 1 = *Lactobacillus acidophilus*
CU. 2 = *Lactobacillus bulgaricus*
CU. 3 = *Lactobacillus fermentum*
CU. 4 = *Lactobacillus acidophilus*
CU. 5 = *Lactobacillus casei* Subsp. *tolerans*
CU. 6 = *Lactobacillus jensenii*

4.4 การทดสอบการเจริญของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้ในอาหารที่มีเกลือระดับความเข้มข้นต่างๆ

เมื่อทดสอบการเจริญของเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์ในอาหารซึ่งเติมเกลือแกงในระดับต่างๆคือ 2.5, 5, 7.5, 10 และ 12.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตรวจพบว่า เชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์เจริญได้ดีมากที่ระดับความเข้มข้นเกลือแกงที่ 5 เปอร์เซนต์ และมีเชื้อ *Lactobacillus* spp. 3 ใน 6 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นเกลือแกงสูงถึง 7.5 เปอร์เซนต์ได้ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.3 ซึ่งสมบัติการทนเกลือแกงนี้จำเป็นต้องใช้เมื่อต้องการเพิ่มจำนวนเชื้อซึ่งเก็บในรูปเชื้อผงแห้งก่อนให้ไก่บริโภคเพราะในอาหารไก่สำเร็จรูปจะมีการเติมเกลือแกงลงในอาหาร เพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ

ตารางที่ 4.3 : การเจริญของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้ในอาหารที่มีเกลือระดับความเข้มข้นต่างๆ

Lactobacillus spp. ที่แยกได้	ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)				
	2.5	5	7.5	10	12.5
CU. 1	+	+	+	-	-
CU. 2	+	+	-	-	-
CU. 3	+	+	+	-	-
CU. 4	+	+	+	-	-
CU. 5	+	+	-	-	-
CU. 6	+	+	-	-	-

+ = *Lactobacillus* spp. สามารถเจริญได้

- = *Lactobacillus* spp. ไม่สามารถเจริญได้

4.5 การทดสอบการเจริญของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้ในอาหารที่มีเกลือน้ำดีระดับความเข้มข้นต่างๆ

เมื่อทดสอบการเจริญของเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์ในอาหารซึ่งเติมเกลือน้ำดีในระดับต่างๆคือ 2.5, 5, 7.5, 10 และ 12.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตรวจพบว่าเชื้อ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 6 สายพันธุ์เจริญได้ดีมากที่ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ 5 เปอร์เซนต์ และมีเชื้อ *Lactobacillus* spp. จำนวน 2 ใน 6 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นเกลือน้ำดีที่ 7.5 เปอร์เซนต์ และจำนวน 1 ใน 6 สายพันธุ์เจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ 10 เปอร์เซนต์ได้ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.4 ซึ่งสมบัติการทนต่อเกลือน้ำดีนี้เป็นคุณสมบัติที่จำเป็นเพื่อความอยู่รอดและเจริญได้ในลำไส้ไก่เหมาะสมต่อการจะนำไปทดลองเสริมอาหารไก่แทนสารปฏิชีวนะ

ตารางที่ 4.4 : การเจริญของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้ในอาหารที่มีเกลือน้ำดีระดับความเข้มข้นต่างๆ

Lactobacillus spp. ที่แยกได้	ความเข้มข้นของเกลือน้ำดี (น้ำหนักต่อปริมาตร)				
	2.5	5	7.5	10	12.5
CU. 1	+	+	-	-	-
CU. 2	+	+	+	+	-
CU. 3	+	+	-	-	-
CU. 4	+	+	+	-	-
CU. 5	+	+	-	-	-
CU. 6	+	+	-	-	-

+ = *Lactobacillus* spp. สามารถเจริญได้

- = *Lactobacillus* spp. ไม่สามารถเจริญได้

4.6 การทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้ (Agar Diffusion method) (มาลิน, 2532)

การทดสอบการต้านทานสารปฏิชีวนะโดยวิธีนี้จะทำการวางแผ่นสารปฏิชีวนะ(แผ่นกระดาษกรองเล็กๆที่ชุบสารปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นตามที่ตั้งมาตรฐานไว้)ชนิดต่างๆลงบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโดยวางแผ่น ให้ห่างกันพอสมควรเพื่อให้อ่านผลได้ชัดเจน หลังจากเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°เซลเซียส 18-24 ชั่วโมง โดยการทดสอบครั้งนี้ใช้สารปฏิชีวนะทั้งสิ้น 14 ชนิด ซึ่งผลการทดลองปรากฏว่าสารปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบแต่ละชนิดจะให้ผลการยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 6 สายพันธุ์ แตกต่างกันไป โดยการแปลผลความกว้างของบริเวณยับยั้งเปรียบเทียบกับมาตรฐานของสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ได้กำหนดไว้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.5 การทดสอบนี้เพื่อดูแนวโน้มว่าเชื้อ *Lactobacillus* spp. 6 สายพันธุ์ เมื่อผสมกับอาหารที่มีสารปฏิชีวนะเชื้อ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 6 สายพันธุ์จะสามารถอยู่รอดได้หรือไม่

4.7 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้

การทดสอบนี้กระทำเพื่อต้องการทราบว่าถ้าใช้ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะต่ำลงจากขนาดความแรงของยาที่กำหนดในแผ่นมาตรฐานที่ความเข้มข้นใดที่เป็นความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะเริ่มต้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้โดยการทดสอบกับสารปฏิชีวนะทั้งสิ้น 6 ชนิด ซึ่งสารปฏิชีวนะทั้ง 6 ชนิด นี้เป็นที่นิยมใส่ผสมกับอาหารสัตว์ ซึ่งผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.6.1 และ 4.6.2

ตารางที่ 4.5 : การทดสอบความไวต่อสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้

ชนิดของสารปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ	ความแรงของแผ่นยา	*Lactobacillus* spp. ที่แยกได้					
		CU. 1	CU. 2	CU. 3	CU. 4	CU. 5	CU. 6
Ampicillin	10 mcg.	I	S	I	S	I	S
Amikacin	30 mcg.	I	S	R	R	R	I
Bacitracin	10 Unit	S	S	S	S	S	S
Cefazalin	30 mcg.	S	I	I	I	I	S
Chloramphenical	30 mcg.	S	S	S	S	S	S
Gentamycin	10 mcg.	I	S	R	R	R	I
Lincomycin	30 mcg.	I	R	S	I	S	R
Neomycin	30 mcg.	R	I	R	R	S	I
Novobiocin	30 mcg.	S	S	R	S	S	S
Penicillin	10 Unit	S	S	I	S	S	S
Streptomycin	10 mcg.	R	R	R	S	S	S
Sulfamethazine	250 mcg.	R	R	R	R	R	R
Tetracyclin	30 mcg.	S	S	S	S	R	S
Vancomycin	30 mcg.	R	R	R	S	R	R

CU. 1 = *Lactobacillus acidophilus*

CU. 2 = *Lactobacillus bulgaricus*

CU. 3 = *Lactobacillus fermentum*

CU. 4 = *Lactobacillus acidophilus*

CU. 5 = *Lactobacillus casei* Subsp. *tolerans*

CU. 6 = *Lactobacillus jensenii*

S = Sensitive

I = Intermediate

R = Resistance

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6.1 : ความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus* spp. (MIC)

ชนิดของสารปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ	ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ (mcg/ml)									*L. spp*
	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.125	6.25	12.5	25	
Ampicillin	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 1
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	CU. 2
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	CU. 3
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 4
	+	+	+	+	+	-	-	-	-	CU. 5
	+	+	+	+	+	-	-	-	-	CU. 6
Chloramphenical	+	+	+	+	+	+	+	+	-	CU. 1
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	CU. 2
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	CU. 3
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	CU. 4
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	CU. 5
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	CU. 6
Cloxacillin	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 1
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	CU. 2
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	CU. 3
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 4
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 5
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 6

+ = *Lactobacillus* spp. สามารถเจริญได้

- = *Lactobacillus* spp. ไม่สามารถเจริญได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.6.2 : ความเข้มข้นต่ำสุดของสารปฏิชีวนะชนิดต่างๆ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus* spp. (MIC)

ชนิดของสารปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ	ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ (mcg/ml)									*L. spp*
	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.125	6.25	12.5	25	
Gentamycin	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 1
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	CU. 2
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	CU. 3
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 4
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	CU. 5
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 6
Kanamycin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	CU. 1
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	CU. 2
	+	+	+	+	+	+	+	+	-	CU. 3
	+	+	+	+	+	-	-	+	+	CU. 4
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	CU. 5
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	CU. 6
Streptomycin	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 1
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 2
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	CU. 3
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 4
	+	+	+	+	+	+	+	-	-	CU. 5
	+	+	+	+	+	+	-	-	-	CU. 6

+ = *Lactobacillus* spp. สามารถเจริญได้

- = *Lactobacillus* spp. ไม่สามารถเจริญได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 การทดสอบภาคสนามเพื่อดูการอยู่รอดของ *Lactobacillus* spp. แบบผสม 6 สายพันธุ์ จากลำไส้ไก่

ใช้ลูกไก่พันธุ์ CB-12-95 CN เพศผู้ อายุ 1 วัน จำนวนทั้งหมด 224 ตัว แบ่งลูกไก่ออกเป็น 7 กลุ่มๆ ละ 32 ตัว ใช้เวลาในการเลี้ยง 19 วัน แบ่งกลุ่มไก่ดังนี้คือ กลุ่มควบคุม (Control) 1 กลุ่ม อีก 6 กลุ่มเป็นลูกไก่ที่ได้รับ *Lactobacillus* spp. โดยการเตรียม *Lactobacillus* spp. (ตามวิธีในข้อ 3.8 บทที่ 3) แล้วป้อนใส่ปากให้ไก่กินโดยตรง (Direct Force Feed) สุ่มไก่มาฆ่าทุก 5 วันของการเลี้ยงเพื่อนำลำไส้มาตรวจหาจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่นและจำนวน *Lactobacillus* spp. ดังผลตาม ตารางที่ 4.7 ซึ่งแสดงให้เห็นการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นของไก่อายุ 1, 5, 10, 15 และ 19 วันของการเลี้ยง ปรากฏว่า ไก่กลุ่มควบคุมที่อายุ 1 วัน พบจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่น 3.8×10^2 เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ซึ่งเป็นตัวแทนค่าแบคทีเรียประจำถิ่นของทุกๆกลุ่มทดสอบ ผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นจะสอดคล้องกับภาพที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 4.10 ก.) ซึ่งพบว่ามีจำนวนแบคทีเรียที่ยึดเกาะกับผนังลำไส้จำนวนน้อยมาก มีทั้งแบคทีเรียที่เป็นรูปกลมและรูปแท่ง ตรวจนับแบคทีเรียประจำถิ่นพบว่ามีจำนวนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนสิ้นสุดการทดลองวันที่ 19 โดยจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นของไก่กลุ่มควบคุมคือ 5.8×10^9 เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ (ตามตารางที่ 4.7) เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบในวันแรกของการเลี้ยง 7 เท่าตัว แสดงว่าไก่ได้รับแบคทีเรียประจำถิ่นเป็นประจำทำให้แบคทีเรียเหล่านั้นมีการเพิ่มจำนวนครอบครองพื้นที่ผิวของลำไส้ไก่เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆและเมื่อพิจารณาภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนในวันที่ 5, 10, 15 และ 19 พบว่าความหนาแน่นของแบคทีเรียประจำถิ่นที่เกาะติดกับผนังลำไส้ไก่เพิ่มมากขึ้นเป็นลำดับ (รูปที่ 4.10-4.16) สอดคล้องกับผลการนับจำนวนและรูปร่างของแบคทีเรียที่พบมีทั้งรูปร่างกลม, แท่ง หลากหลายแตกต่างกัน เมื่อกลับมาพิจารณาผลการนับจำนวนของ *Lactobacillus* spp. ในไก่กลุ่มควบคุม (ตารางที่ 4.8) ปรากฏว่า เริ่มพบแบคทีเรียประจำถิ่นที่เป็น *Lactobacillus* spp. ในวันแรกของการเลี้ยงแต่จำนวนยังน้อยมากๆจนไม่สามารถรายงานผลได้ (<10 estimate) แต่จะมาพบมากจนสามารถรายงานผลได้ในวันที่ 19 ของการเลี้ยง 4.8×10^2 เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ (ตารางที่ 4.8) โดยปกติ *Lactobacillus* spp. เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในลำไส้ไก่ทั่วไป

จากตารางที่ 4.7 พบว่าแบคทีเรียประจำถิ่นทั้งหมดเพิ่มขึ้นจากวันที่ 5 ถึงวันที่ 19 ของการเลี้ยง 10^5 เท่าในกลุ่มทดสอบ 1 ($10^4 \rightarrow 10^9$ เซลล์/กรัมลำไส้ไก่), กลุ่มทดสอบ 4 ($10^4 \rightarrow 10^9$ เซลล์/กรัมลำไส้ไก่), กลุ่มทดสอบ 6 ($10^7 \rightarrow 10^{12}$ เซลล์/กรัมลำไส้ไก่) และเพิ่มขึ้น 10^7เท่าใน

กลุ่มทดสอบ 5 ($10^4 \rightarrow 10^{11}$ เซลล์/กรัมลำไส้ไก่) ส่วนในกลุ่มควบคุมจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่นทั้งหมดเพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 ถึงวันที่ 19 ของการเลี้ยง 10^7 เท่า ($10^2 \rightarrow 10^9$ เซลล์/กรัมลำไส้ไก่) เป็นที่น่าสังเกตุว่าในกลุ่มทดสอบ 2 และ 3 จำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่นเพิ่มขึ้นน้อย โดยกลุ่มทดสอบ 2 เพิ่ม 10^2 เท่า ($10^6 \rightarrow 10^8$ เซลล์/กรัมลำไส้ไก่) กลุ่มทดสอบ 3 เพิ่ม 10^4 เท่า ($10^5 \rightarrow 10^9$ เซลล์/กรัมลำไส้ไก่)

จากตารางที่ 4.8 พบว่าจำนวนของ *Lactobacillus* spp. เพิ่มขึ้นจากวันที่ 5 ถึงวันที่ 19 ของการเลี้ยงดังนี้คือ กลุ่มทดสอบ 1 พบจำนวน *Lactobacillus* spp. เพิ่มขึ้น 10^2 เท่า ($10^2 \rightarrow 10^4$ เซลล์/กรัมลำไส้ไก่), กลุ่มทดสอบ 2 เพิ่มขึ้น 10^3 เท่า ($10^2 \rightarrow 10^5$ เซลล์/กรัมลำไส้ไก่), กลุ่มทดสอบ 3 และ 4 เพิ่มขึ้น 10^4 เท่า (10^2-$10^3 \rightarrow 10^6$-10^7 เซลล์/กรัมลำไส้ไก่), กลุ่มทดสอบ 5 เพิ่มขึ้น 10^6 เท่า ($10^2 \rightarrow 10^8$ เซลล์/กรัมลำไส้ไก่), กลุ่มทดสอบ 6 เพิ่มขึ้น 10^5 เท่า ($10^4 \rightarrow 10^9$ เซลล์/กรัมลำไส้ไก่) และกลุ่มควบคุมเพิ่มขึ้น 10^1 เท่า (<10 estimate $\rightarrow 10^2$ เซลล์/กรัมลำไส้ไก่) เมื่อนำจำนวนของ *Lactobacillus* spp. (ตารางที่ 4.8) เปรียบเทียบกับจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่น (ตารางที่ 4.7) จะพบอัตราส่วนของแบคทีเรียที่นับจำนวนได้เมื่อสิ้นสุดการทดลองดังนี้คือ $10^4/10^9$ ในกลุ่มทดสอบ 1, $10^5/10^8$ ในกลุ่มทดสอบ 2, $10^7/10^9$ ในกลุ่มทดสอบ 3, $10^6/10^9$ ในกลุ่มทดสอบ 4, $10^8/10^{11}$ ในกลุ่มทดสอบ 5, $10^9/10^{12}$ ในกลุ่มทดสอบ 6, และ $10^2/10^9$ ในกลุ่มควบคุมจะเห็นว่ามากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียประจำถิ่น ในกลุ่มทดสอบควรเป็น *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ให้ไก่กิน ในขณะที่กลุ่มควบคุมพบจำนวน *Lactobacillus* spp. ที่ไก่ได้รับจากธรรมชาติประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ และจากตารางที่ 4.9 เป็นการยืนยันได้ว่า *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ป้อนให้ไก่กิน 5 สายพันธุ์ (ยกเว้นสายพันธุ์ CU. 3) สามารถอยู่รอดได้ในลำไส้ไก่จริง นั่นคือการให้ *Lactobacillus* spp. แบบผสมสามารถที่จะใช้เป็นโพรไบโอติกได้

ผลการนับจำนวนของ *Lactobacillus* spp. แบบผสมของไก่กลุ่มทดสอบทั้ง 6 กลุ่ม ในวันที่ 19 ของการเลี้ยงทำให้สามารถพิจารณาจำนวนและความถี่ในการให้ไก่กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสม ที่เหมาะสมเพื่อเป็นตัวแทนในการทดสอบต่อไปให้ไก่กินจำนวน 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วัน (กลุ่มทดสอบ 3) เพราะเมื่อเทียบไก่กลุ่มทดสอบ 1-3 เมื่อสิ้นสุดการทดลองปรากฏว่าไก่กลุ่มทดสอบ 3 พบจำนวน *Lactobacillus* spp. แบบผสมมากที่สุดคือ 4.8×10^7 เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ สำหรับไก่กลุ่มทดสอบ 4-6 เมื่อสิ้นสุดการทดลองวันที่ 19 พบว่าไก่กลุ่มทดสอบ 6 ตรวจนับจำนวน *Lactobacillus* spp. ได้มากที่สุด ประมาณ 9.4×10^9 เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ เพราะฉะนั้นเมื่อพิจาราณาถึงขนาดและความถี่ในการให้ไก่กินเชื้อ ควรให้กินจำนวน 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์

ทุกวัน (กลุ่มทดสอบ 6) แต่เมื่อนำผลการนับจำนวนของ *Lactobacillus* spp. เมื่อสิ้นสุดการทดลองวันที่ 19 ของกลุ่มทดสอบ 3 และ6 มาเปรียบเทียบกัน พบว่าจำนวนของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นจึงควรเลือกใช้จำนวนและความถี่ของการให้กินเชื้อในกลุ่มทดสอบ3 เป็นตัวแทนในการศึกษาต่อไป เพราะกลุ่มทดสอบ 6 จำเป็นต้องให้กินเชื้อทุกวัน ซึ่งในเชิงปฏิบัติจริงเป็นการสิ้นเปลืองเวลาและแรงงานมากกว่า และเหตุผลที่ไม่เลือกใช้กลุ่มทดสอบ 1, 2 เพราะเมื่อเปรียบเทียบวันที่ 19 ของการเลี้ยงกับกลุ่มทดสอบ 3 พบว่าจำนวนของ *Lactobacillus* spp. ที่พบมีจำนวนประมาณ 10^4-10^5 เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ ในขณะที่กลุ่มทดสอบ 3 พบประมาณ 10^7 เซลล์ /กรัมลำไส้ไก่

การนับจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่นและ *Lactobacillus* spp. เปรียบเทียบกับภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนของไก่กลุ่มทดสอบทั้ง 6 กลุ่มกับกลุ่มควบคุม (Control) ได้ผลดังนี้คือ

1. เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นและ *Lactobacillus* spp. จะพบว่าเมื่อเวลาผ่านไปจะพบจำนวนมากขึ้นซึ่งผลสอดคล้องกับรูปถ่ายที่ได้จากกล้องอิเลคตรอนจะเห็นว่าความหนาแน่นของแบคทีเรียมากขึ้นเรื่อยๆตามรูปที่ 4.10-4.16
2. รูปร่างของแบคทีเรียที่พบระหว่างไก่กลุ่มทดสอบที่ 6 กลุ่มและกลุ่มควบคุมพบว่าไก่กลุ่มทดสอบทั้ง 6 กลุ่มจะพบแบคทีเรียส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นท่อนซึ่งน่าจะเป็น *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ให้กิน ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนของ *Lactobacillus* spp. ที่ตรวจนับจำนวนได้ตามตารางที่ 4.9
3. ความหนาแน่นของจำนวนแบคทีเรียที่พบจากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนระหว่างไก่กลุ่มทดสอบทั้ง 6 กลุ่ม พบว่ารูปร่างของเชื้อที่พบของไก่ทั้ง 6 กลุ่ม จะมีรูปร่างเป็นแท่งคาดว่าจะเป็นเชื้อ *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ให้กินซึ่งมีผลยืนยันสนับสนุนคือ สามารถที่จะตรวจพบจำนวนของ *Lactobacillus* spp. (ดังแสดงในตารางที่ 4.8) และความหนาแน่นของแบคทีเรียจากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนกลุ่มทดสอบ 6 มีจำนวนแบคทีเรียหนาแน่นที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการนับจำนวนแบคทีเรีย (ตารางที่ 4.8) และการตรวจพบชนิดของ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 5 สายพันธุ์เดิมที่ป้อนให้ไก่กินตั้งแต่เริ่มต้น (ตารางที่ 4.9) และความหนาแน่นของแบคทีเรียในกลุ่มทดสอบ 3-6 มีแนวโน้มโดยเฉลี่ยหนาแน่นกว่ากลุ่มทดสอบ 1, 2 ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจนับจำนวนในตารางที่ 4.8

ผลการทดสอบหาชนิดของสายพันธุ์ *Lactobacillus* spp. ปรากฏว่าวันที่ 5 ของการเลี้ยงไก่ในทุกกลุ่มทดสอบจะพบ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ CU. 1, 2, 4 แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ทั้ง 3 นี้มีประสิทธิภาพสูงในการอยู่รอดในลำไส้ไก่เนื่องจากพบก่อนสายพันธุ์อื่นๆ วันที่ 10 ของการเลี้ยงกลุ่มทดสอบ 1-3 ยังคงพบ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ CU. 1, 2, 4 ส่วนกลุ่มทดสอบ 4-6 เริ่มพบ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ 5, 6 ก่อนกลุ่มทดสอบ 1-3 อาจเนื่องมาจากความถี่ของการให้ *Lactobacillus* spp. ต่างกัน กล่าวคือ กลุ่มทดสอบ 1-3 ให้กินทุกๆ 3 วัน ส่วนกลุ่มทดสอบ 4-6 ให้กินทุกวัน จึงทำให้โอกาสที่ไก่จะได้รับ *Lactobacillus* spp. สูงกว่า และอีกเหตุผลที่ว่าวันที่ 5 ของการเลี้ยงจะยังไม่พบ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ CU.5, 6 อาจเนื่องจาก *Lactobacillus* spp. 2 สายพันธุ์นี้เจริญช้า วันที่ 15 ของการเลี้ยง ปรากฏว่าไก่กลุ่มทดสอบทุกกลุ่มพบ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ 1, 2, 4, 5, 6 และจะพบทั้ง 5 สายพันธุ์นี้ตลอดจนสิ้นสุดการเลี้ยง ส่วนสายพันธุ์ CU. 3 ไม่พบตลอดการเลี้ยงทั้ง 19 วัน เพราะ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ CU. 3 นั้นจำเพาะกับพันธุ์ของไก่ๆที่ใช้ทดสอบอาจไม่เหมาะสมกับการอยู่รอดของสายพันธุ์นี้ทำให้ตลอดการทดลองทั้ง 19 วัน ไม่พบ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ CU. 3 เลย

นั่นคือ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 5 สายพันธุ์ ยกเว้นสายพันธุ์ CU. 3 สามารถอยู่รอดได้ในลำไส้ไก่จริง เนื่องจากสามารถที่จะตรวจนับจำนวนของ *Lactobacillus* spp. แบบผสมในลำไส้ไก่ได้ (ตารางที่ 4.8) และสามารถตรวจกลับไปได้ว่า *Lactobacillus* spp. เป็นเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ที่ให้ไก่กลุ่มทดสอบกินจริง(ตารางที่4.9)โดยการนำมาทดสอบดูความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรท

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.7 : Total viable cell count ของแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของไก่โดยวิธี spread plate

อายุของไก่ (วัน)	เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ กลุ่มทดสอบ						
	1	2	3	4	5	6	กลุ่มควบคุม
1	-	-	-	-	-	-	3.8×10^{2}
5	4.5×10^{4}	1.9×10^{6}	1.3×10^{5}	3.9×10^{4}	3.2×10^{4}	3.0×10^{7}	5.5×10^{5}
10	9.2×10^{6}	2.4×10^{7}	7.3×10^{7}	4.2×10^{6}	9.4×10^{7}	1.6×10^{9}	6.5×10^{9}
15	1.6×10^{8}	4.6×10^{7}	9.2×10^{8}	6.0×10^{8}	1.6×10^{9}	9.4×10^{10}	8.2×10^{9}
19	1.1×10^{9}	6.3×10^{8}	3.0×10^{9}	3.9×10^{9}	4.4×10^{11}	4.7×10^{12}	5.8×10^{9}

ก.กลุ่มทดสอบ : 1 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{4} เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วันของการเลี้ยง

2 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{5} เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วันของการเลี้ยง

3 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{6} เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วันของการเลี้ยง

4 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{4} เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุกวันของการเลี้ยง

5 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{5} เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุกวันของการเลี้ยง

6 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{6} เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุกวันของการเลี้ยง

กลุ่มควบคุม = กลุ่มไก่ทดสอบที่ไม่ให้กิน *Lactobacillus* spp.

ข. เครื่องหมาย - = ไม่ได้ทดสอบเนื่องจากไก่ที่ใช้มีพ่อ แม่พันธุ์เดียวกันจึงใช้กลุ่มควบคุมเป็นตัวแทนในการทดสอบ

ค. ภาวะการเลี้ยง : อาหารเลี้ยงแบคทีเรียประจำถิ่นใช้ BHI Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ง. ผลของตัวเลขที่แสดงในตาราง เป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทำ 3 ซ้ำต่อการทดลอง

ตารางที่ 4.8 : Total viable cell count ของ *Lactobacillus* spp. ในระบบทางเดินอาหารของไก่โดยวิธี spread plate

อายุของไก่ (วัน)	เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ กลุ่มทดสอบ						
	1	2	3	4	5	6	กลุ่มควบคุม
0	-	-	-	-	-	-	<10 estimate
5	6.0×10^{2}	3.9×10^{2}	2.1×10^{3}	5.0×10^{2}	8.2×10^{2}	6.4×10^{4}	<10 estimate
10	1.9×10^{3}	8.6×10^{4}	1.7×10^{4}	7.2×10^{3}	2.9×10^{5}	7.9×10^{6}	<10 estimate
15	7.8×10^{3}	3.5×10^{5}	4.2×10^{6}	9.2×10^{4}	3.2×10^{6}	6.5×10^{8}	<100 estimate
19	2.5×10^{4}	4.7×10^{5}	4.8×10^{7}	6.4×10^{6}	1.6×10^{8}	9.4×10^{9}	4.8×10^{2}

ก.กลุ่มทดสอบ : 1 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{4} เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วันของการเลี้ยง

2 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{5} เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วันของการเลี้ยง

3 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{6} เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วันของการเลี้ยง

4 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{4} เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุกวันของการเลี้ยง

5 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{5} เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุกวันของการเลี้ยง

6 = กลุ่มไก่ทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{6} เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุกวันของการเลี้ยง

กลุ่มควบคุม = กลุ่มไก่ทดสอบที่ไม่ให้กิน *Lactobacillus* spp.

ข. เครื่องหมาย - = ไม่ได้ทดสอบเนื่องจากไก่ที่ใช้มีพ่อ แม่พันธุ์เดียวกันจึงใช้กลุ่มควบคุมเป็นตัวแทนในการทดสอบ

< 10 estimate = ระดับความเจือจาง 1:10 พบโคโลนีของเชื้อน้อยกว่า 30-300 โคโลนี

< 100 estimate = ระดับความเจือจาง 1:10, 1:100 พบโคโลนีของเชื้อน้อยกว่า 30-300 โคโลนี

ค. ภาวะการเลี้ยง : อาหารเลี้ยง *Lactobacillus* spp. ใช้ MRS Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°เซลเซียส 24-48 ชั่วโมง

ง. ผลของตัวเลขที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทำ 3 ซ้ำต่อการทดลอง

ตารางที่ 4.9 : *Lactobacillus* spp. ที่ตรวจพบจากลำไส้ไก่หลังการให้ *Lactobacillus* spp. แบบผสม

อายุของไก่ (วัน)	กลุ่มทดสอบ					
	1	2	3	4	5	6
1	-	-	-	-	-	-
5	CU. 1,2,4	CU. 1,2,4	CU. 1,2,4	CU. 1,2,4	CU. 1,2,4	CU. 1,2,4
10	CU. 1,2,4	CU. 1,2,4	CU. 1,2,4	CU. 1,2,4,6	CU. 1,2,4,5	CU. 1,2,4,6
15	CU. 1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6	CU.1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6
19	CU. 1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6	CU. 1,2,4,5,6

CU.1 = *Lactobacillus acidophilus*

CU.2 = *Lactobacillus bulgaricus*

CU.3 = *Lactobacillus fermentum*

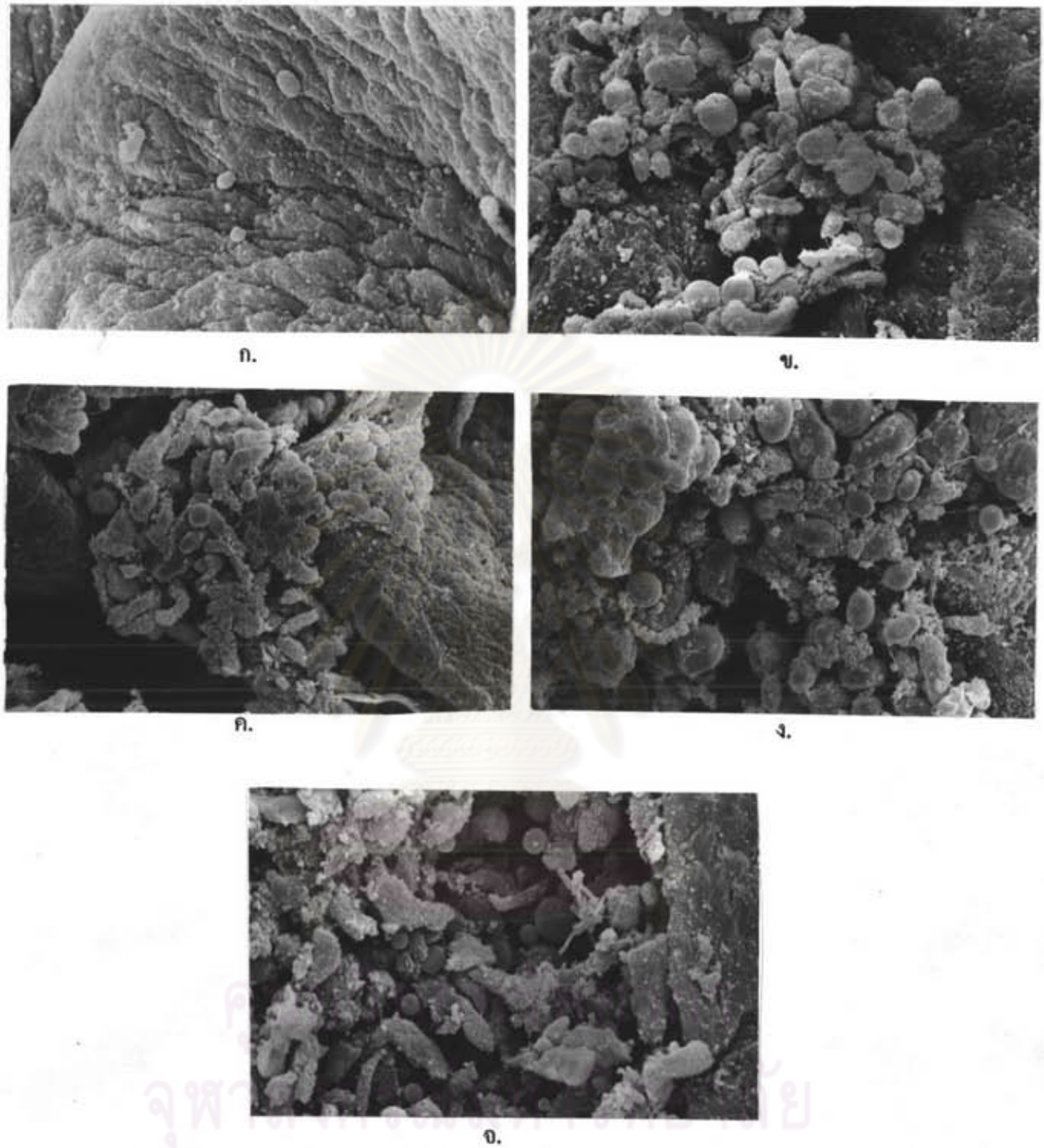
CU.4 = *Lactobacillus acidophilus*

CU.5 = *Lactobacillus casei* Subsp. *tolerans*

CU.6 = *Lactobacillus jensenii*

ภาวะการเลี้ยง : อาหารเลี้ยง *Lactobacillus* spp. ใช้ MRS Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°เซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แยกโคโลนีบริสุทธิ์และยืนยันชนิดของ *Lactobacillus* spp. โดยติดตามผลการใช้คาร์โบไฮเดรทชนิดต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก.

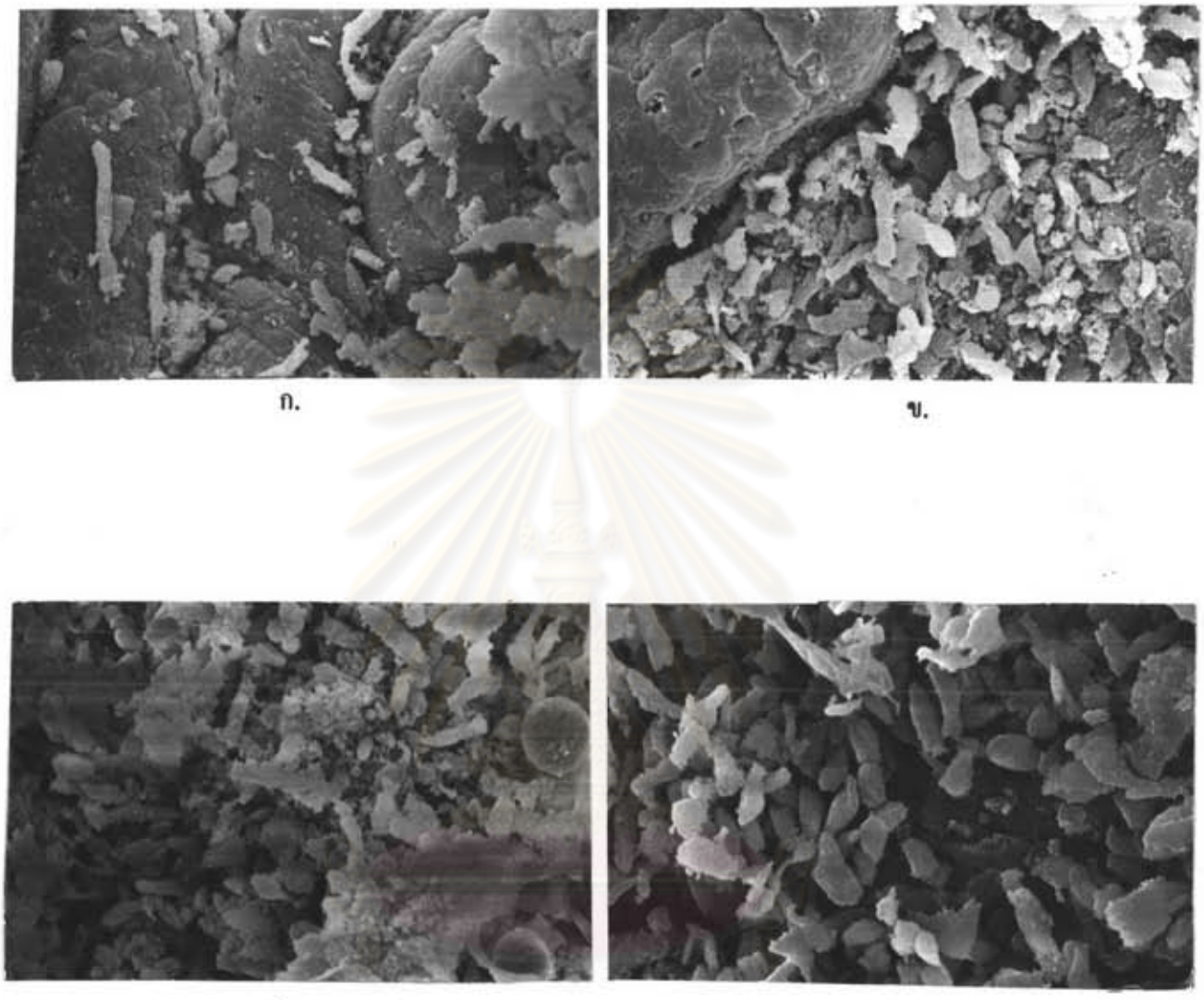
ข.

ค.

ง.

จ.

รูปที่ 4.10 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม (Control) ก. อายุ1วัน กำลังขยาย 1,300 เท่า ข.อายุ 5 วัน กำลังขยาย 1,200 เท่า ค. อายุ10วัน กำลังขยาย 1,000 เท่า ง. อายุ15วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า จ. อายุ 19 วัน กำลังขยาย 2,000 เท่า

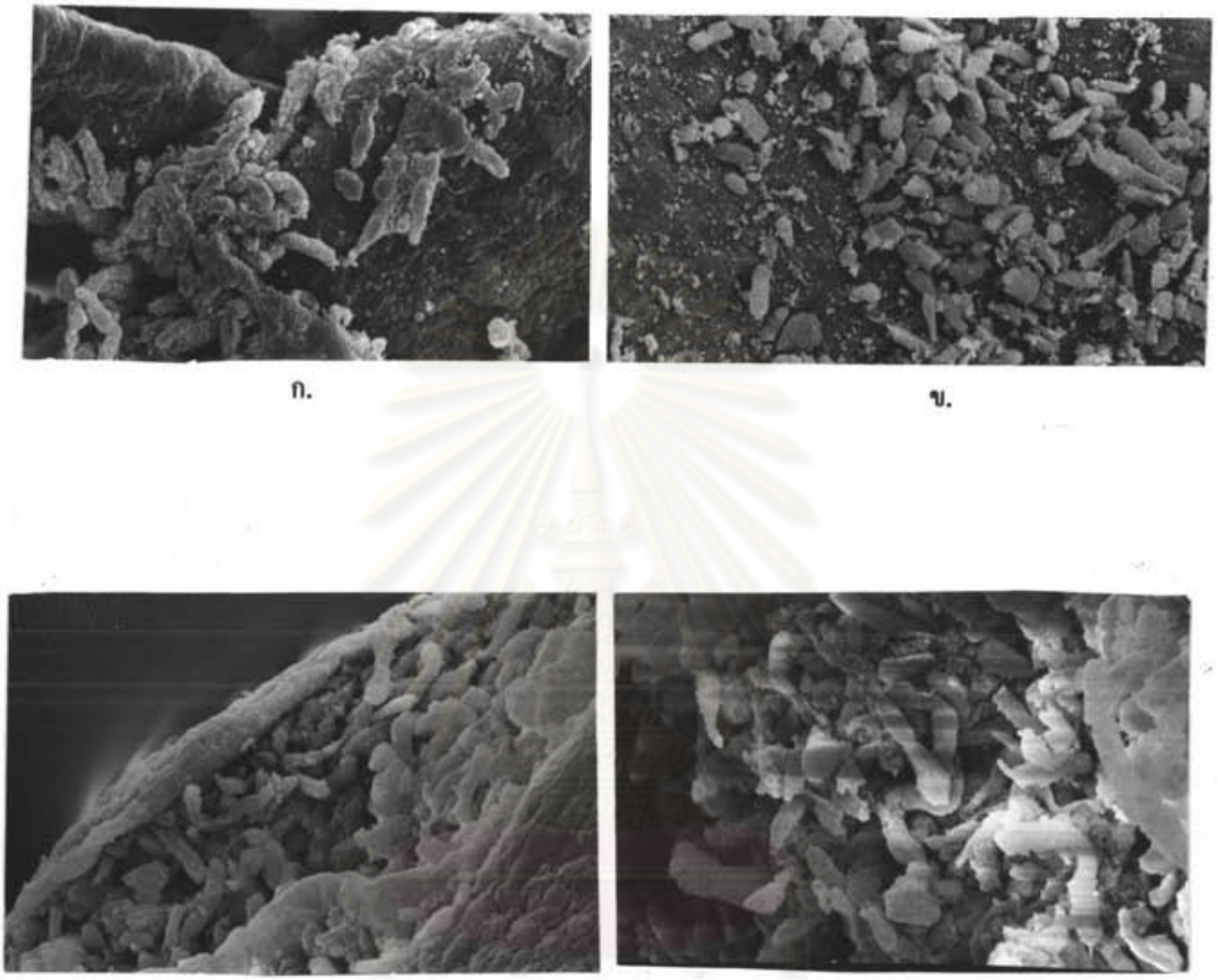


ก. ข.

ค. ง.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.11 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่ของไก่กลุ่มทดสอบ 1 (ปริมาณ *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ป้อน 10^4 เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วัน) ก. อายุ 5 วัน กำลังขยาย 1,200 เท่า ข. อายุ 10 วันกำลังขยาย 1,300 เท่า ค. อายุ 15 วัน กำลังขยาย 1,300 เท่า ง. อายุ 19 วัน กำลังขยาย 1,600 เท่า

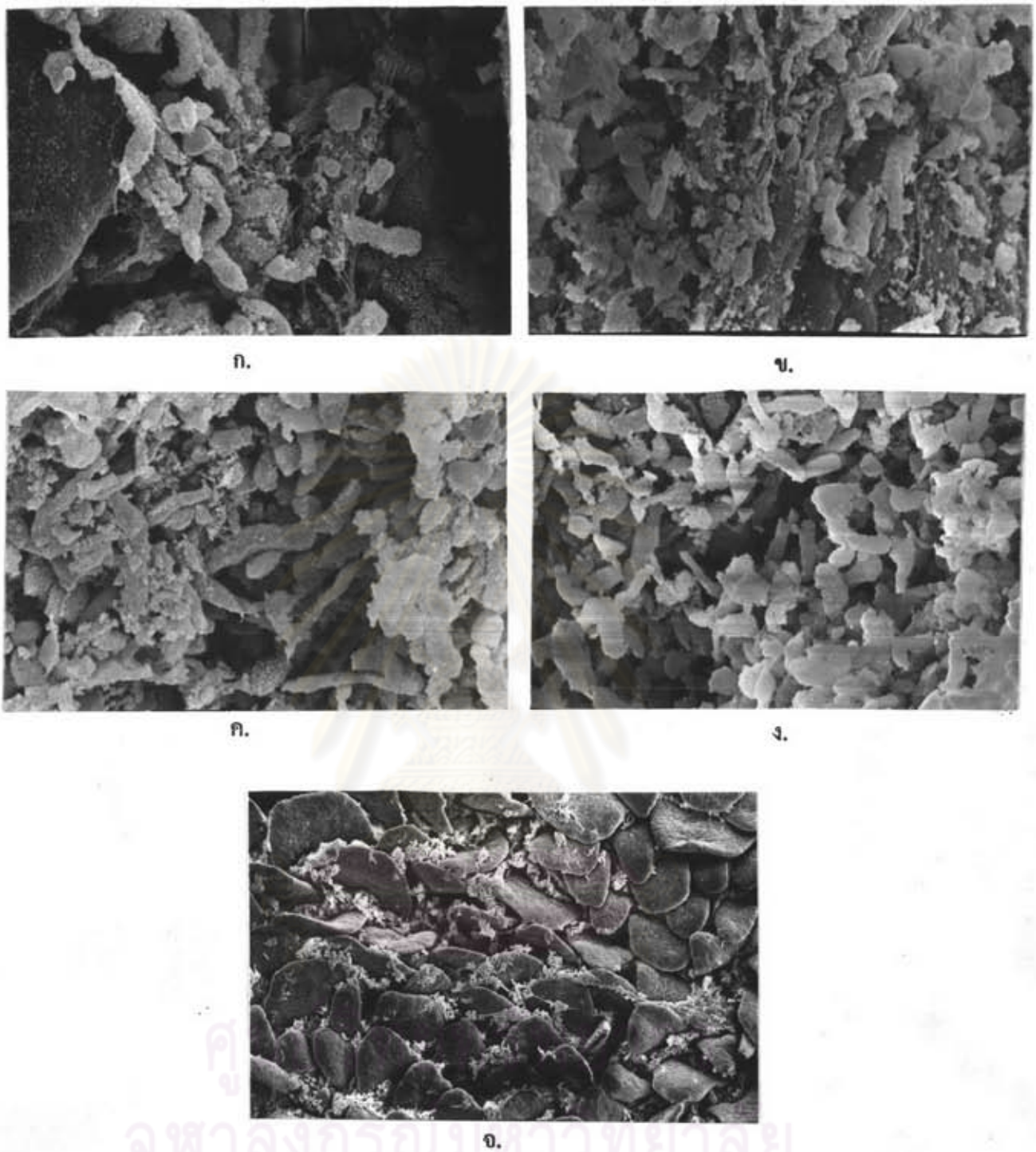


ก. ข.

ค. ง.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.12 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่ของไก่กลุ่มทดสอบ 2 (ปริมาณ *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ป้อน 10^5 เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วัน) ก. อายุ 5 วัน กำลังขยาย 1,000 เท่า ข. อายุ 10 วัน กำลังขยาย 1,000 เท่า ค. อายุ 15 วัน กำลังขยาย 1,000 เท่า ง. อายุ 19 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า



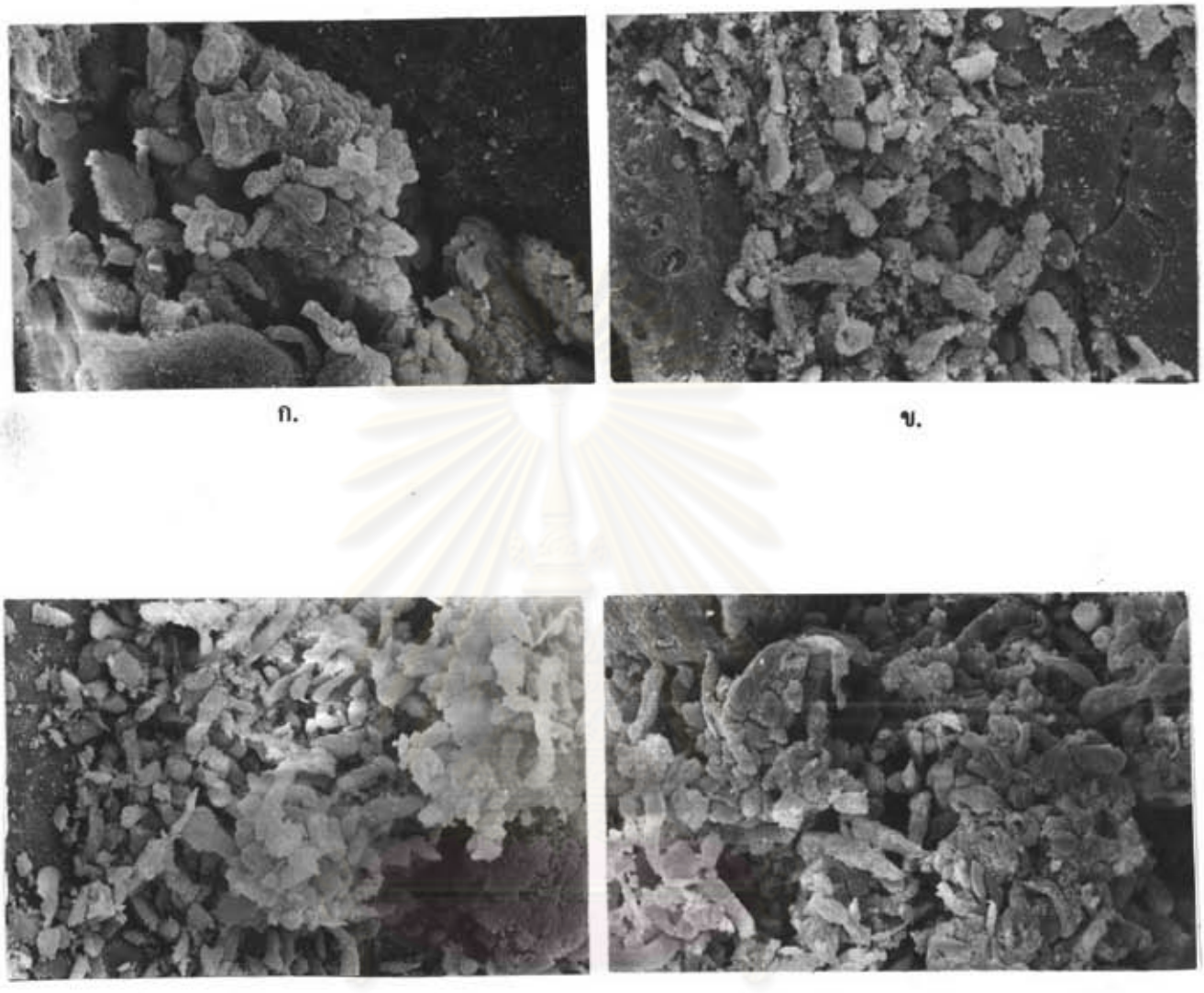
ก. ข.

ค. ง.

จ.

รูปที่ 4.13 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่ของไก่กลุ่มทดสอบ 3 (ปริมาณ *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ป้อน 10^6 เซลล์/มล./สาย พันธุ์ ทุก 3 วัน) ก. อายุ 5 วัน กำลังขยาย 1,600 เท่า ข. อายุ 10 วัน กำลังขยาย 1,300 เท่า ค. อายุ 15 วัน กำลังขยาย 1,800 เท่า ง. อายุ 19 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า จ. อายุ 10 วัน กำลังขยาย 100 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

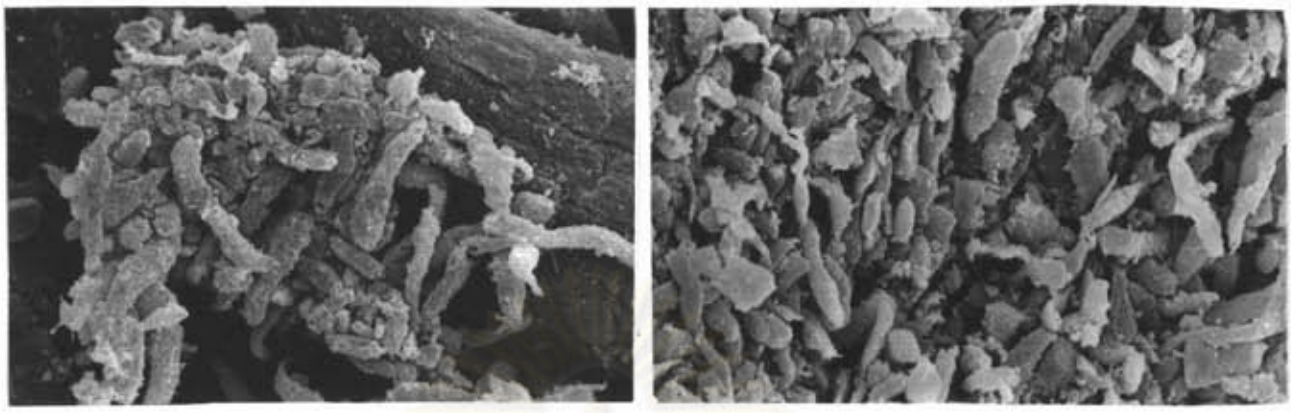


ก. ข.

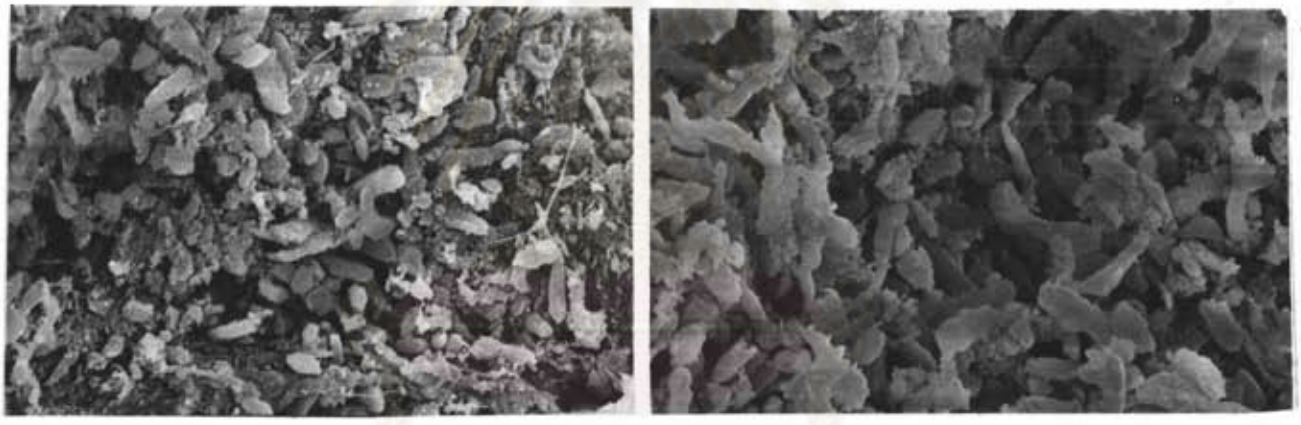
ค. ง.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.14 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่ของไก่กลุ่มทดสอบ 4 (ปริมาณ *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ป้อน 10^4 เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุกวัน) ก. อายุ 5 วัน กำลังขยาย 1,000 เท่า ข. อายุ 10 วัน กำลังขยาย 1,300 เท่า ค. อายุ 15 วัน กำลังขยาย 1,000 เท่า ง. อายุ 19 วัน กำลังขยาย 1,300 เท่า



ก. ข.

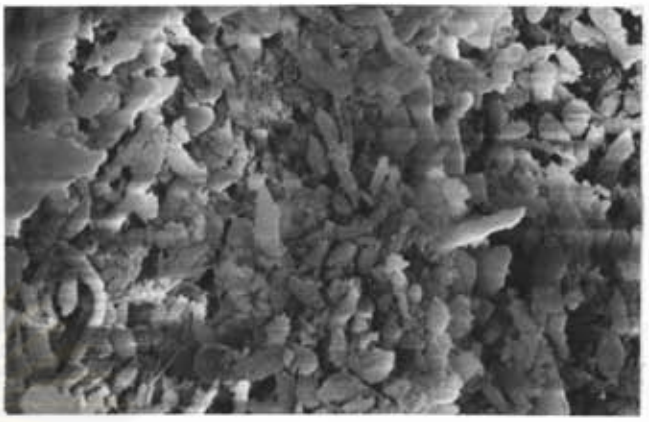


ค. ง.

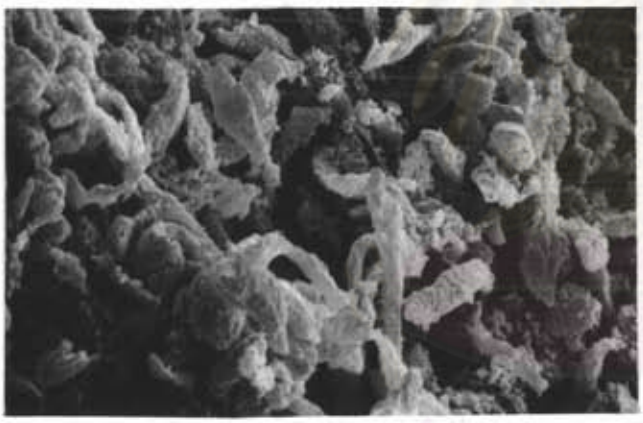
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.15 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่ของไก่กลุ่มทดสอบ 5 (ปริมาณ *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ป้อน 10^5 เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุกวัน) ก. อายุ 5 วัน กำลังขยาย 1,300 เท่า ข. อายุ 10 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า ค. อายุ 15 วัน กำลังขยาย 1,000 เท่า ง. อายุ 19 วัน กำลังขยาย 1,300 เท่า

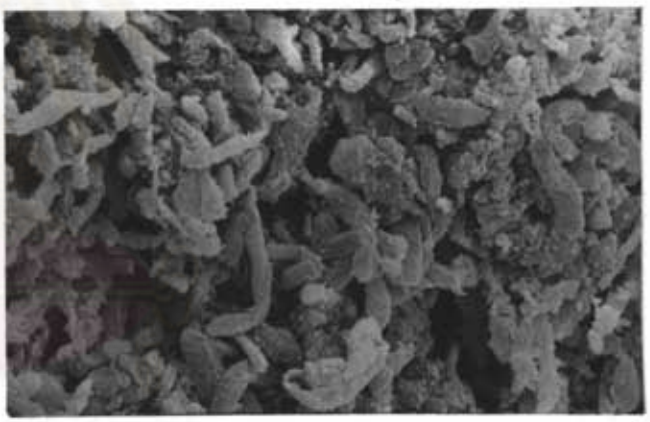
ก.



ข.



ค.



ง.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.16 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่ของไก่กลุ่มทดสอบ 6 (ปริมาณ *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ป้อน 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุกวัน) ก. อายุ 5 วัน กำลังขยาย 1,000 เท่า ข. อายุ 10 วัน กำลังขยาย 1,000 เท่า ค. อายุ 15 วัน กำลังขยาย 1,300 เท่า ง. อายุ 19 วัน กำลังขยาย 1,200 เท่า

4.9 การทดสอบภาคสนามเพื่อดูผลของ *Lactobacillus* spp. แบบผสมต่อการเจริญเติบโตของไก่

จากผลการทดลอง 4.8 ทำให้ได้ปริมาณของ *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่จะให้ไก่กิน 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก3วันของการเลี้ยงเพื่อใช้ในการทดลองต่อมาโดยที่การทดสอบนี้จะใช้ลูกไก่พันธุ์ CB-12-95 CN เพศผู้อายุ 1 วัน ทั้งหมด 128 ตัว ใช้เวลาในการเลี้ยง 42 วัน แบ่งกลุ่มไก่เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม (Control) 1 กลุ่ม จำนวน 64 ตัวและกลุ่มทดสอบ 1 กลุ่ม จำนวน 64 ตัว การทดสอบนี้จะเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในด้านน้ำหนักตัวของไก่ เมื่อสิ้นสุดการทดลองและประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่ทั้ง 2 กลุ่ม โดยจะทำการสุ่มฆ่าไก่ทุกๆ 7 วันของการเลี้ยง เพื่อนำลำไส้ไก่มาตรวจหาจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่น และจำนวน *Lactobacillus* spp. ปรากฏผลตามตารางที่ 4.10 ดังนี้ คือ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบในวันแรกของการเลี้ยงไก่กลุ่มทดสอบพบจำนวน9.3×10^2เซลล์/กรัมลำไส้ไก่และกลุ่มควบคุมพบแบคทีเรียประจำถิ่นจำนวนพอๆกันคือ 3.4×10^3 เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ ตรวจไม่พบ *Lactobacillus* spp. ในกลุ่มไก่ทั้ง 2 กลุ่มเมื่ออายุ 1 วัน ซึ่งสอดคล้องกับตารางที่ 4.7 และการทดลองที่ 4.8 และภาพถ่ายที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบแบคทีเรียที่เกาะกับผนังลำไส้จำนวนน้อยและมีรูปร่างกลม,แท่ง(รูปที่ 4.17-4.20)และเมื่อทำการตรวจนับจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่นของไก่ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ปรากฏว่ามีจำนวนเพิ่มมากขึ้นตามเวลาของการเลี้ยงแสดงว่าไก่ได้รับแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมตลอดเวลาจึงทำให้จำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นสูงขึ้นเรื่อยๆ แบคทีเรียประจำถิ่นในกลุ่มควบคุมวันที่ 1-42 เพิ่มจากจำนวน 10^2-10^{12} เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ เพิ่มขึ้นประมาณ 6 เท่า ส่วนจำนวนของ *Lactobacillus* spp. ในกลุ่มควบคุมวันที่ 1-42 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบจำนวน 8.5×10^{12} เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ ซึ่งจะเริ่มพบ *Lactobacillus* spp. ที่ไก่ได้รับจากธรรมชาติในกลุ่มควบคุมประมาณวันที่ 14 ของการเลี้ยง แต่จำนวนยังน้อยอยู่จนไม่สามารถรายงานผลได้และเมื่อนำผลนี้ไปเปรียบเทียบกับตารางผลการทดลองที่ 4.8 ของการทดลองที่ 4.8 ปรากฏว่าไก่กลุ่มควบคุมของการทดลองที่ 4.8 จะเริ่มพบ *Lactobacillus* spp. ตั้งแต่วันแรกของการเลี้ยงแต่จะพบจำนวนน้อยมากจนยังไม่สามารถรายงานได้เช่นกันเหตุที่การทดลองที่ 4.9 พบ *Lactobacillus* spp. ที่ได้จากธรรมชาติช้ากว่าการทดลองที่ 4.8 อาจเนื่องจากไก่ได้รับเชื้อ *Lactobacillus* spp. จากสิ่งแวดล้อมช้ากว่าและเมื่อติดตามผลไปเรื่อยๆจะพบว่า *Lactobacillus* spp. ของกลุ่มควบคุมการทดลองที่ 4.9 จะเริ่มพบจำนวนมากขึ้นประมาณวันที่ 28 จำนวน 10^2-10^3 เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ และจะคงจำนวนปริมาณเช่นนี้ตลอดจนสิ้นสุดการทดลองเพราะ *Lactobacillus* spp. เข้ามาอยู่ในลำไส้ไก่ช้ากว่าแบคทีเรียประจำถิ่นชนิดอื่นๆจึงไม่สามารถครอบครองพื้นที่ในลำไส้ไก่ส่วนใหญ่ได้จึงทำให้ *Lactobacillus* spp. มีพื้นที่ยึดเกาะจำนวนจำกัดทำให้การเพิ่มจำนวนประชากรของแบคทีเรียถูกจำกัดโดยพื้นที่ๆมีอยู่จำกัดและเมื่อดูภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบ

ส่องกราดของกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.17-4.20) ตั้งแต่อายุ 1-42 วันมาเปรียบเทียบกับการนับจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่นจะพบว่าความหนาแน่นของแบคทีเรียที่เห็นจากภาพจะค่อยๆเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งสัมพันธ์กับการตรวจนับจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่นในตารางที่4.10 และรูปร่างของแบคทีเรียที่เห็นจะมีรูปร่างทั้งกลมและแท่งหลากหลายแตกต่างกันไปตั้งแต่วันแรกของการเลี้ยงจนสิ้นสุดการเลี้ยงซึ่งผลการตรวจนับจำนวน (ตารางที่ 4.10) และภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (รูปที่ 4.17-4.20) สัมพันธ์กับการทดลองที่ 4.8 ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

ในกลุ่มทดสอบอายุ 7 วันของการเลี้ยงจะเริ่มพบ *Lactobacillus* spp. จำนวน 9.3×10^{3} เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ ซึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมๆจะไม่พบ *Lactobacillus* spp.ซึ่งอาจเป็นข้อยืนยันเบื้องต้นได้ว่า *Lactobacillus* spp. ที่พบในลำไส้ไก่เป็น *Lactobacillus* spp. ที่ป้อนให้ไก่กินทุก 3 วัน เพราะในขณะที่กลุ่มควบคุมซึ่งเลี้ยงในภาวะแวดล้อมเดียวกันกลับไม่พบ *Lactobacillus* spp. และเมื่อได้นำ *Lactobacillus* spp. มาทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรทเพื่อแยกชนิดของสายพันธุ์ ปรากฏว่าพบสายพันธุ์ CU.1, 2, 4, 5 ไม่พบสายพันธุ์ CU. 3, 6 ซึ่งเมื่อนำผลนี้ไปเปรียบเทียบกับตารางที่ 4.9 ของการทดลองที่ 4.8 ที่เริ่มพบสายพันธุ์ CU. 1, 2, 4 ตั้งแต่วันที่ 5 ของการเลี้ยง แต่การทดลองนี้พบสายพันธุ์ CU. 5 ด้วย อาจเป็นเพราะว่าอายุของไก่มากกว่า คือ การทดลองที่ 4.9 นี้สุ่มฆ่าไก่วันที่ 7 ของการเลี้ยง ส่วนการทดลองที่ 4.8 สุ่มฆ่าไก่วันที่ 5 ของการเลี้ยงและเมื่อทดลองเลี้ยงไก่กลุ่มทดสอบต่อไปปรากฏว่า จำนวนของ *Lactobacillus* spp. เพิ่มจำนวนขึ้นตามลำดับ และพบเกือบครบทุกสายพันธุ์ประมาณวันที่ 14 ของการเลี้ยง และพบติดต่อกันเรื่อยๆจนสิ้นสุดการทดลอง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองที่ 4.8 ตารางที่ 4.9 สิ่งที่เหมือนกันคือสายพันธุ์ CU. 3 ไม่พบตลอดการทดลอง ผลการทดสอบที่ไม่พบสายพันธุ์ CU. 3 สอดคล้องกับผลการทดลองในข้อ 4.8 อาจเป็นเพราะสายพันธุ์ CU. 3 จำเพาะกับพันธุ์ของไก่จริงๆ จึงตรวจไม่พบสายพันธุ์นี้ในลำไส้ไก่ และเมื่อพิจารณาจำนวนของ *Lactobacillus* spp. ที่พบในวันที่ 14 ของการเลี้ยงจำนวน 4.8×10^{6} เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ ซึ่งเพิ่มจากวันที่ 7 ของการเลี้ยงถึง 10^{3} เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ อาจเป็นเพราะช่วงนี้เชื้อมีการเจริญมากที่สุดประกอบกับพื้นที่ผิวของลำไส้ไก่ยังเหลือมากทำให้การเพิ่มจำนวนไม่ถูกจำกัดโดยขนาดของพื้นที่ผิวของลำไส้ไก่ แต่หลังจากช่วงวันที่ 14 ของการเลี้ยงจนถึงวันที่ 42 ปรากฏว่าจำนวน *Lactobacillus* spp. เพิ่มขึ้นน้อยมากจนเกือบคงที่ อาจเป็นเพราะพื้นที่ยึดเกาะในลำไส้ไก่ลดน้อยลงทำให้การเพิ่มจำนวนถูกจำกัดและเมื่อพิจารณาถึงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนจะพบว่าความหนาแน่นของแบคทีเรียที่เห็นในรูปที่ 4.17-4.20 ในกลุ่มทดสอบมีความหนาแน่นของแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้นตามอายุของไก่ ซึ่งสัมพันธ์กับการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในตารางที่ 4.20 และแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่จากภาพจะมีรูปร่างเป็นแท่งซึ่งคาดว่าเชื้อที่เห็นน่าจะเป็น *Lactobacillus*

spp. แบบผสมที่ให้ไก่กิน เนื่องจากมีผลการทดลองนับจำนวน *Lactobacillus* spp. ในตารางที่ 4.10 เป็นการยืนยันสนันสนุน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ 4.8 ที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

ตารางที่ 4.11 แสดงถึงการเจริญของไก่เปรียบเทียบกันระหว่างไก่กลุ่มทดสอบและไก่กลุ่มควบคุมตลอดทั้ง 42 วันของการเลี้ยง โดยที่น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นการทดลองของไก่ทั้ง 2 กลุ่ม พอๆกัน ทำการชั่งน้ำหนักไก่ทั้ง 2 กลุ่ม ทุกๆ 7 วันของการเลี้ยงพบว่าน้ำหนักสุทธิ (น้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลองลบด้วยน้ำหนักแรกฟักจากไข่) พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของไก่กลุ่มทดสอบ คือ 1822.80 กรัม เพิ่มขึ้น 49.26 เท่า และน้ำหนักเฉลี่ยของไก่กลุ่มควบคุม คือ 1759.90 กรัม เพิ่มขึ้น 43.9 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11) เมื่อนำเอาอัตราการเจริญเติบโตของไก่ทั้ง 2 กลุ่มนี้เมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 3 และ 6 ของการทดลองไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p<0.05$) และเมื่อนำเอาข้อมูลน้ำหนักเฉลี่ยของไก่ทั้ง 2 กลุ่มไปทำเป็นกราฟ พบว่าช่วงอายุของไก่ 0-3 สัปดาห์ ความชันของกราฟในไก่ทั้ง 2 กลุ่มจะพอๆกัน อาจเนื่องมาจากเป็นช่วงที่ *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ให้กินมีการเจริญปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมในระบบทางเดินอาหารของไก่จึงต้องใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนและยังต้องแข่งการเจริญกับแบคทีเรียประจำถิ่นชนิดอื่นๆ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของไก่ช่วง 3 สัปดาห์แรกกับผลการนับจำนวน *Lactobacillus* spp. ในตารางที่ 4.10 จะพบว่า ช่วงนี้เป็นช่วงที่ *Lactobacillus* spp. มีการเจริญเพิ่มจำนวนสูงมาก และเมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตของไก่กลุ่มทดสอบช่วงหลังจาก 3 สัปดาห์เป็นต้นไป พบว่าความชันของกราฟจะชันกว่าไก่กลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัดเจนตลอดไปจนสิ้นสุดการทดลอง 42 วัน ซึ่งเหตุผลอาจเป็นเพราะว่า *Lactobacillus* spp. สามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมในลำไส้ไก่ได้ และมีการเพิ่มจำนวนในอัตราค่อนข้างคงที่เริ่มมีการสร้างสารต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของไก่ เช่น ไวตามิน บี ชนิดต่างๆ, Growth Factor, สารต่อต้านจุลชีพ (Shirota, 1962) จึงทำให้ไก่กลุ่มทดสอบมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าไก่กลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัดเจน และอีกเหตุผล คือ อาจจะเป็นช่วงที่ไก่เริ่มมีการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่ประกอบกับการที่ไก่ได้รับสารบางอย่างที่มีประโยชน์จาก *Lactobacillus* spp. เป็นปัจจัยช่วยส่งเสริมอัตราการเจริญเติบโตของไก่ให้ดียิ่งขึ้น จากกราฟที่ 4.12 จะเห็นได้ว่าถ้าทำการเลี้ยงไก่ต่อไปอีก หลังจาก 42 วัน คาดว่าอัตราการเจริญเติบโตของไก่กลุ่มทดสอบจะยังคงสูงกว่าไก่กลุ่มควบคุมต่อไปอีกแต่ความชันของกราฟจะเริ่มลดลง

ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (Feed Conversion Ratio) ของไก่ทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าไก่กลุ่มทดสอบและไก่กลุ่มควบคุม มีค่า FCR ช่วง 1-19 วัน ดังนี้ คือ 0.892 และ 0.802 ตามลำดับ ส่วน

FCR ช่วง 20-42 วัน มีค่าดังนี้คือ 1.562 และ 1.565 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10) เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) พบว่าค่า FCR ทั้ง 2 ช่วง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.10 : **Total viable cell count ของแบคทีเรียประจำถิ่น และ *Lactobacillus* spp. ในระบบทางเดินอาหารของไก่โดยวิธี spread plate และชนิด *Lactobacillus* spp. ที่พบหลังจากการให้ *Lactobacillus* spp.**

อายุของไก่ (วัน)	เซลล์/กรัมลำไส้ไก่			
	แบคทีเรียประจำถิ่น		*Lactobacillus* spp. แบบผสม	
	กลุ่มทดสอบ	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดสอบ	กลุ่มควบคุม
1	9.3×10^{2}	3.4×10^{3}	NF	NF
7	4.8×10^{0}	1.5×10^{6}	9.3×10^{3} (a)	NF
14	4.5×10^{8}	4.3×10^{7}	4.8×10^{6} (b)	<10 estimate
21	7.2×10^{9}	8.7×10^{10}	5.3×10^{7} (b)	<100 estimate
28	3.2×10^{10}	5.3×10^{11}	1.6×10^{8} (b)	4.3×10^{2}
35	4.3×10^{10}	4.2×10^{11}	4.1×10^{8} (b)	2.4×10^{3}
42	6.1×10^{12}	5.2×10^{14}	3.8×10^{9} (b)	8.5×10^{3}

กลุ่มทดสอบ = กลุ่มไก่ที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. ปริมาณ 10^{0} เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วันของการเลี้ยง

a = พบ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ CU.1, 2, 4, 5

b = พบ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์ CU.1, 2, 4, 5, 6 ยกเว้น CU. 3

NF = ไม่พบ *Lactobacillus* spp.

< 10 estimate = ระดับความเจือจาง 1:10 พบโคโลนีของเชื้อน้อยกว่า 30-300 โคโลนี

< 100 estimate = ระดับความเจือจาง 1:10, 1:100 พบโคโลนีของเชื้อน้อยกว่า 30-300 โคโลนี

ตารางที่ 4.11 : การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และอัตราการตายของไก่กลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม

สิ่งที่ศึกษา	กลุ่มทดสอบ	กลุ่มควบคุม
จำนวนไก่เมื่อเริ่มทดลอง (ตัว)	64.00	64.00
จำนวนไก่ที่ตาย (ตัว)	5.00	3.00
เปอร์เซ็นต์การตาย	7.81	4.68
จำนวนไก่ที่เหลือจากการทดลอง (ตัว)	37.00	40.00
น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อเริ่มต้นทดลอง (กรัม)	41.15	42.06
น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อ 1 สัปดาห์ (กรัม)	206.18	195.00
น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อ 2 สัปดาห์ (กรัม)	452.15	424.74
น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อ 3 สัปดาห์ (กรัม)	793.61*	784.65*
น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อ 4 สัปดาห์ (กรัม)	1309.00	1188.90
น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อ 5 สัปดาห์ (กรัม)	1636.00	1473.00
น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อ 6 สัปดาห์ (กรัม)	1864.00	1802.00
น้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มใน 6 สัปดาห์ (กรัม)	1822.80*	1759.90*
อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (กรัม)	43.40	41.90
ประสิทธิภาพการใช้อาหารช่วง 1-19 วัน	0.892**	0.802**
ประสิทธิภาพการใช้อาหารช่วง 20-42 วัน	1.562**	1.565**

กลุ่มทดสอบ = กลุ่มไก่ที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสม ปริมาณ 10^{9} เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วันของการเลี้ยง

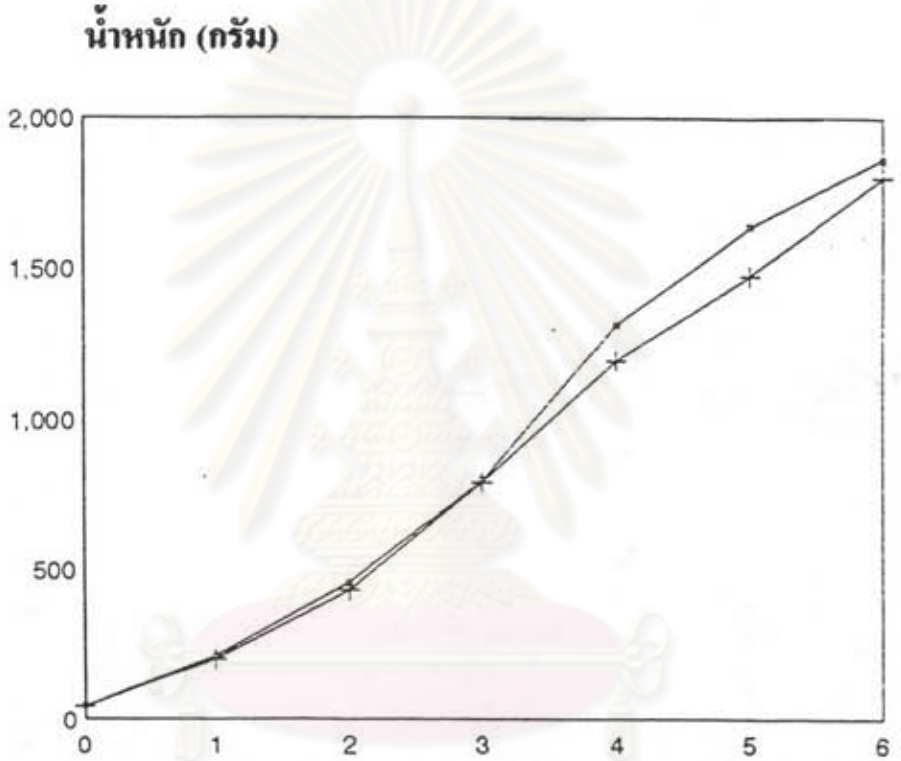
กลุ่มควบคุม = กลุ่มไก่ที่ไม่ให้กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสม

* = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

** = ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

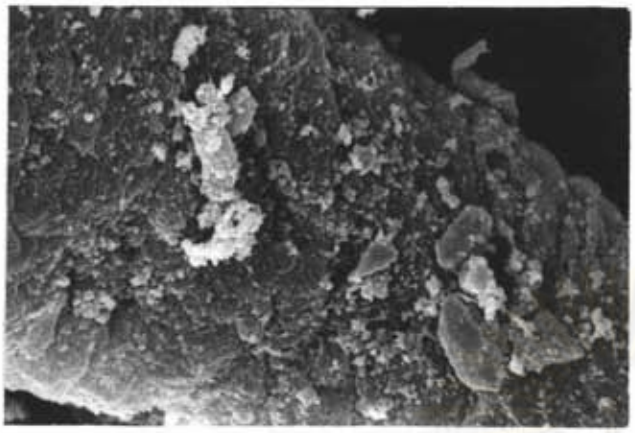
ตารางที่ 4.12 : กราฟเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโดยเฉลี่ยของไก่ที่กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสมในกลุ่มทดสอบ (–□–) ตั้งแต่แรกเกิดทุก 3 วัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ และกับไก่กลุ่มควบคุม (+)



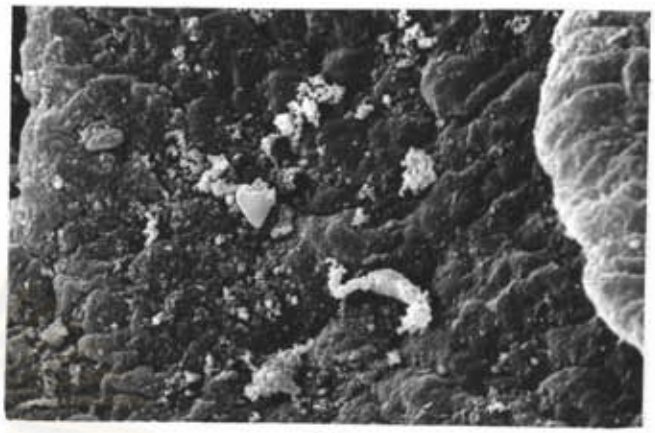
หมายเหตุ : Slope ไก่กลุ่มทดสอบ = 353.817

Slope ไก่กลุ่มควบคุม = 333.615

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

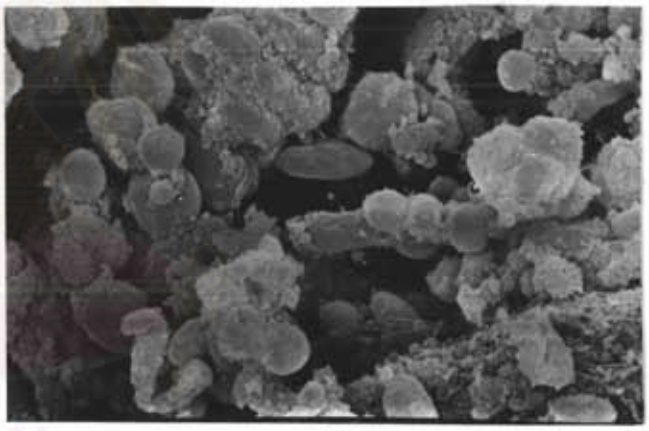


ก.



ข.

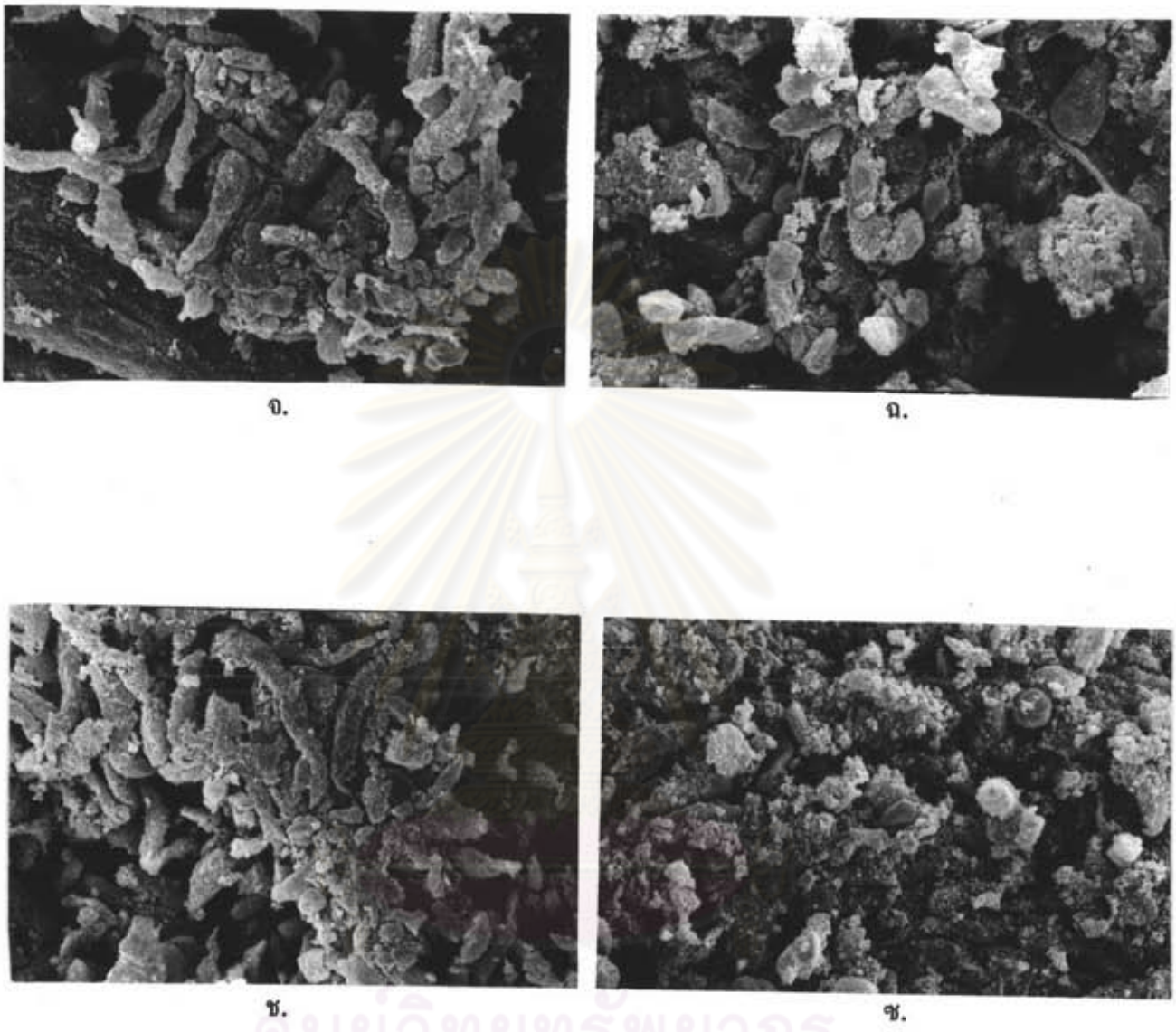
ค.



ง.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.17 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่ของไก่อายุ 1วัน ก. กลุ่มทดสอบ (ปริมาณ *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ป้อน 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วัน) กำลังขยาย 1,800 เท่า ข. กลุ่มควบคุม(Control) ไม่ให้กินเชื้อกำลังขยาย 1,500 เท่า และ อายุ 7 วัน ค. กลุ่มทดสอบ 3 กำลังขยาย 1,100 เท่า ง. กลุ่มควบคุม (Control) กำลังขยาย 1,500 เท่า



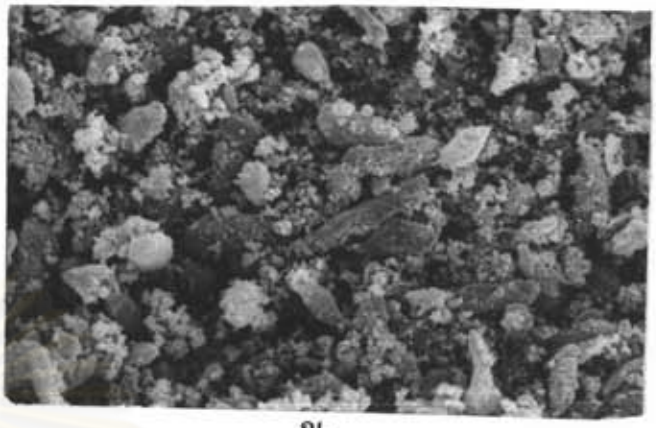
จ. ฉ.

ช. ซ.

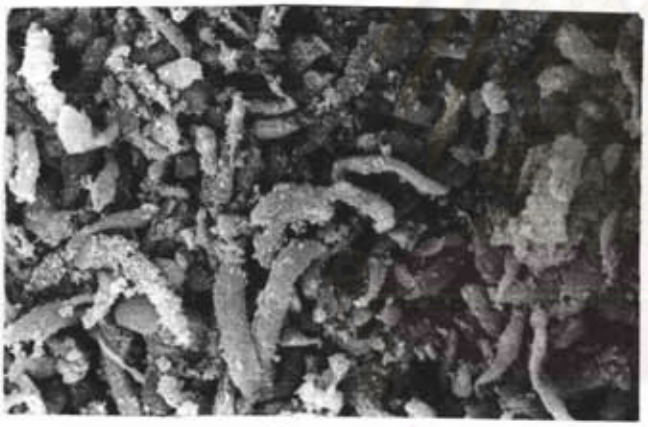
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.18 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่ของไก่อายุ 14 วัน จ. กลุ่มทดสอบ (ปริมาณ *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ป้อน 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วัน) กำลังขยาย 1,100 เท่า ฉ. กลุ่มควบคุม (Control) ไม่ให้กินเชื้อกำลังขยาย 1,500 เท่า และ อายุ 21 วัน ช. กลุ่มทดสอบ 3 กำลังขยาย 1,200 เท่า ซ. กลุ่มควบคุม (Control) กำลังขยาย 1,600 เท่า

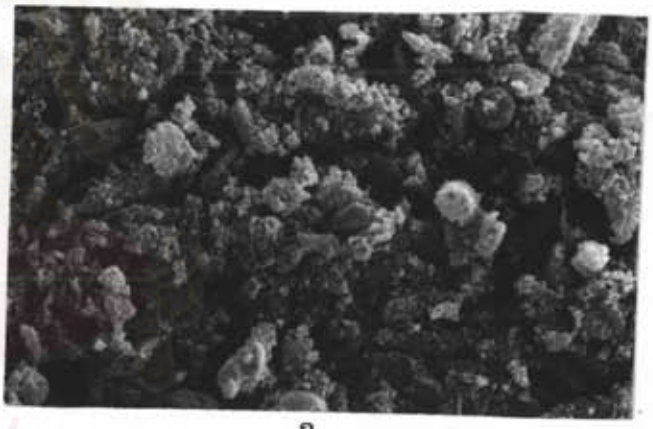
ฌ.



ญ.



ฎ.

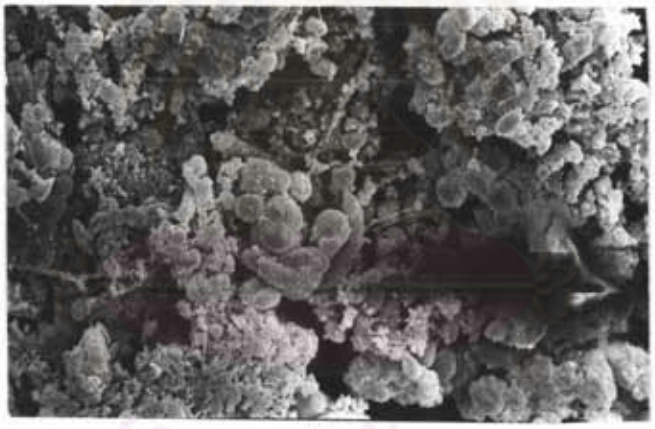


ฏ.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.19 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่ของไก่อายุ 28 วัน ฌ. กลุ่มทดสอบ (ปริมาณ *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ป้อน 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วัน) กำลังขยาย 1,100 เท่า ญ. กลุ่มควบคุม(Control) ไม่ให้กินเชื้อกำลังขยาย 1,300 เท่า และ อายุ 35 วัน ฎ. กลุ่มทดสอบ 3 กำลังขยาย 1,100 เท่า ฏ. กลุ่มควบคุม (Control) กำลังขยาย 1,800 เท่า

ฐ.



ฑ.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.20 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่ของไก่อายุ 42 วัน ฐ. กลุ่มทดสอบ (ปริมาณ *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ป้อน 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก3วัน) กำลังขยาย 1,100 เท่า ฑ. กลุ่มควบคุม (Control) ไม่ให้กินเชื้อ กำลังขยาย 1,100 เท่า

4.10 การทดสอบผลของ *Lactobacillus* spp. แบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ *Salmonella typhimurium* ในไก่

ใช้ลูกไก่พันธุ์ CB-12-95 CN เพศผู้อายุ 1 วัน จำนวนทั้งหมด 256 ตัว ใช้เวลาในการเลี้ยง 25 วัน โดยแบ่งกลุ่มทดสอบเป็น 8 กลุ่มๆละ 32 ตัวดังนี้คือ

กลุ่มทดสอบควบคุม = กลุ่มทดสอบที่ไม่ให้กินเชื้อ *Lactobacillus* spp. แบบผสม และ *Salmonella typhimurium*

กลุ่มทดสอบโพรไบโอติก(P) = กลุ่มทดสอบที่ให้กินเชื้อ *Lactobacillus* spp. แบบผสม จำนวน 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ ทุก 3 วัน

กลุ่มทดสอบ P/H_2O = กลุ่มทดสอบที่ให้กินเชื้อ *Lactobacillus* spp. แบบผสม ในรูปเชื้อผงแห้งโดยละลายน้ำให้ไก่กินทุก 3 วัน

กลุ่มทดสอบ S/H_2O = กลุ่มทดสอบที่ให้กินเชื้อ *Salmonella typhimurium* จำนวน 10^3 เซลล์/มล.ในวันแรกของการเลี้ยงไก่

กลุ่มทดสอบ P_0/S = กลุ่มทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. จำนวน 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ และให้กิน *Salmonella typhimurium* จำนวน 10^3 เซลล์/มล. พร้อมๆกันในวันแรกของการเลี้ยงไก่

กลุ่มทดสอบ P_3/S = กลุ่มทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสม จำนวน 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ ในวันที่ 1,3 ของการเลี้ยง และให้กินเชื้อ*Salmonella typhimurium* จำนวน 10^3 เซลล์/มล. ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงไก่

กลุ่มทดสอบ P_6/S = กลุ่มทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสม จำนวน 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ในวันที่1,3 ,6 ของการเลี้ยง และให้กินเชื้อ *Salmonella typhimurium* จำนวน 10^3 เซลล์/มล. ในวันที่ 6 ของการเลี้ยงไก่

กลุ่มทดสอบ P_{12}/S = กลุ่มทดสอบที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสม จำนวน 10^6 เซลล์/มล./สายพันธุ์ ในวันที่ 1,3,6,12 ของการเลี้ยง และให้กินเชื้อ *Salmonella typhimurium* จำนวน 10^3 เซลล์ /มล. ในวันที่ 12 ของการเลี้ยงไก่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อสุ่มไก่มาฆ่าทุก5วันของการเลี้ยงนำลำไส้ไก่มาตรวจสอบหาจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่น, *Lactobacillus* spp. และ *Salmonella typhimurium* ปรากฏผลดังตารางที่ 4.13 ดังนี้ คือ กลุ่มควบคุม (Control) พบว่าจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบในวันแรกของการเลี้ยง คือ 2.5×10^{2} เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ เป็นจำนวนที่ถือว่ายังน้อยอยู่ผลการนับจำนวนจะสอดคล้องกับการทดลองที่ 4.8 ตารางที่ 4.7 และการทดลองที่ 4.9 ตารางที่ 4.10 ที่กล่าวมาข้างต้น และเมื่อพิจารณารูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน จะพบว่าความหนาแน่นของเชื้อยังน้อยและพบเชื้อรูปร่างเป็นแท่ง,กลม หลากหลายแตกต่างกันไปและจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆสอดคล้องกับความหนาแน่นของเชื้อที่เห็นจากรูป ส่วนการนับจำนวน *Lactobacillus* spp. ปรากฏว่า ในวันแรกยังไม่พบจะเริ่มพบ *Lactobacillus* spp. ในวันที่ 19 ของการเลี้ยง

กลุ่มทดสอบโพรไบโอติก (P) และ P/H_2O เป็นการศึกษาเบื้องต้นว่าในเชิงปฏิบัติจริงจะสามารถทำ *Lactobacillus* spp. ในรูปเชื้อผงแห้งให้ไก่กินโดยผสมน้ำได้หรือไม่ ผลการนับจำนวนของ *Lactobacillus* spp. ตลอดทั้ง 25 วัน ของการเลี้ยง พบว่าจำนวน *Lactobacillus* spp. ในกลุ่มทดสอบโพรไบโอติกมากกว่ากลุ่ม P/H_2O ประมาณ 10^{2} เซลล์/กรัมลำไส้ไก่เสมอ (ตารางที่ 4.13) และเมื่อพิจารณาวันที่ 25 ของการเลี้ยง กลุ่มโพรไบโอติกจะพบ *Lactobacillus* spp. 2.6×10^{6} เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ ส่วนกลุ่มทดสอบ P/H_2O พบ 3.6×10^{4} เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ เมื่อพิจารณาดูจำนวนของ *Lactobacillus* spp. ที่พบในกลุ่มทดสอบ 2 กลุ่มนี้ ปรากฏว่า กลุ่ม P/H_2O ถึงแม้จะมีจำนวนน้อยกว่าก็จริง แต่เมื่อพิจารณาว่าไก่กลุ่มทดสอบโพรไบโอติก ต้องให้ไก่กิน *Lactobacillus* spp. ทุก 3วันโดยกรอกให้กินโดยตรงซึ่งตรงข้ามกับกลุ่ม P/H_2O ไก่จะได้รับ *Lactobacillus* spp. แบบผสมก็ต่อเมื่อกินน้ำที่ผสมเชื้อไว้และการนำเชื้อผงแห้งผสมน้ำให้ไก่กินเชื้อ *Lactobacillus* spp. จะต้องสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมอาจจะทำให้เซลล์ที่มีชีวิตของ *Lactobacillus* spp. ลดจำนวนลงเมื่อสิ้นสุดการทดลองจำนวนของ *Lactobacillus* spp. ต่างกันประมาณ 10^{2} เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบโพรไบโอติกพบว่าไม่แตกต่างกันแสดงว่า *Lactobacillus* spp. แบบผสมมีประสิทธิภาพในการทนสภาพแวดล้อมได้ดีมากและมีสมบัติการเพิ่มจำนวนได้รวดเร็วจึงสามารถที่จะเข้าไปครอบครองพื้นที่ในลำไส้ไก่กลายเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นได้ ดังนั้นการให้ไก่กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสมสามารถให้ในรูปเชื้อผงแห้งได้โดยที่ความมีชีวิตและสมบัติของ *Lactobacillus* spp. ยังคงอยู่ เมื่อเปรียบเทียบกับการให้ไก่กินในรูปเชื้อเหลวโดยตรง จะเป็นการประหยัดแรงงานและเวลาด้วย

กลุ่มทดสอบ S/H_2O ให้กิน *Salmonella typhimurium* ในวันแรกของการเลี้ยงโดยไม่ได้ให้

Lactobacillus spp. แบบผสม ผลปรากฏว่าในวันที่ 5 ของการเลี้ยงจะตรวจพบเชื้อ *Salmonella typhimurium* จำนวน 2.5×10^5 เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ โดยที่ไก่บางตัวจะแสดงอาการของโรคติดเชื้อ แต่เมื่อติดตามผลการนับจำนวนต่อไปเรื่อยๆ ปรากฏว่าจำนวน *Salmonella typhimurium* จะเริ่มลดน้อยลงแต่ก็จะยังคงมีเชื้อ *Salmonella typhimurium* ในลำไส้ต่อไปจนสิ้นสุดการทดลองการที่จำนวนของ *Salmonella typhimurium* ลดลงเมื่อไก่อายุมากขึ้นอาจเป็นเพราะเมื่อไก่อายุมากขึ้นภูมิคุ้มกันของไก่ก็จะมากขึ้นตาม ทำให้สามารถควบคุมจำนวนเชื้อให้อยู่ในสภาพคงที่ได้แต่ไม่สามารถกำจัดให้หมดไปได้เป็นผลให้ไก่เป็นพาหะของโรคติดเชื้อ *Salmonella typhimurium* ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์-อิเลคตรอนของกลุ่มทดสอบ S/H_2O จะพบความหนาแน่นของเชื้อมากขึ้นเรื่อยๆตามอายุไก่และรูปร่างของเชื้อกลม, แท่ง หลากหลายคล้ายกับกลุ่มควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่นกับ *Salmonella typhimurium* ของกลุ่มทดสอบ S/H_2O จะพบว่าสัดส่วนของแบคทีเรียประจำถิ่นสูงกว่าดังนั้นอาจจะเป็นเหตุผลที่ว่าแบคทีเรียประจำถิ่นสามารถเจริญได้เร็วกว่าเชื้อ *Salmonella typhimurium* ซึ่งถูกจำกัดพื้นที่ในการยึดเกาะลำไส้ไก่ทำให้เป็นการจำกัดการเพิ่มจำนวนไปในตัว จากการสังเกตุดูลักษณะภายนอกของลำไส้ไก่กลุ่มทดสอบ S/H_2O ที่ติดเชื้อ *Salmonella typhimurium* พบว่ามีการอักเสบของลำไส้อย่างเห็นได้ชัดเจน

เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มทดสอบ P_0/S กับกลุ่มทดสอบ S/H_2O พบว่าวันที่ 5 ของการเลี้ยงP_0/S ตรวจพบจำนวน *Salmonella typhimurium* 3.7×10^2 เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ ซึ่งเมื่อเทียบกับกลุ่มทดสอบ S/H_2O ซึ่งพบมากถึง 2.5×10^5 เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ แสดงว่าในกลุ่มทดสอบ P_0/S *Salmonella typhimurium* ถูกยับยั้งไม่ให้มีการเจริญอย่างเต็มที่ซึ่งอาจเกิดเนื่องจาก *Lactobacillus* spp. แบบผสมสามารถสร้างกรดแลคติกๆทำให้pHของลำไส้ลดลงไม่เหมาะต่อการเจริญของ*Salmonella typhimurium* หรืออาจเป็นเพราะ *Lactobacillus* spp. ที่ไก่ได้รับมีจำนวนมากกว่าจำนวนของ *Salmonella typhimurium* ทำให้โอกาสของ *Lactobacillus* spp. ในการแข่งขันที่จะยึดเกาะกับผนังลำไส้ไก่มีสูงกว่าทำให้ *Salmonella typhimurium* มีพื้นที่ๆจะยึดเกาะน้อยลงการเพิ่มจำนวนก็จะน้อยลงตามไปด้วย และเมื่อติดตามผลของการนับจำนวน *Salmonella typhimurium* พบว่ากลุ่มทดสอบ P_0/S จะตรวจไม่พบเชื้อตั้งแต่วันที่ 10 ของการเลี้ยง จนสิ้นสุดการเลี้ยง ซึ่งผลการทดลองนี้จะตรงข้ามกับกลุ่มทดสอบ S/H_2O ซึ่งจะพบ *Salmonella typhimurium* ตลอดไปจนสิ้นสุดการทดลอง เหตุที่กลุ่มทดสอบ P_0/S ไม่พบเชื้ออาจเนื่องจากจำนวนของ *Lactobacillus* spp. เพิ่มจำนวนสูงขึ้นในลำไส้ไก่ทำให้ *Salmonella typhimurium* ไม่มีที่ยึดเกาะหรือเป็นเพราะกรดแลคติก, สารต่อต้านจุลชีพที่ *Lactobacillus* spp. สร้างขึ้น มีผลยับยั้งการเจริญของ *Salmonella typhimurium* ซึ่งผลการทดสอบนี้จะไปสัมพันธ์กับการทดสอบ P_3/S P_6/S และ P_{12}/S ซึ่งตรวจไม่พบ *Salmonella typhimurium* เลย

แต่จำนวนของ *Lactobacillus* spp. จะพบจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆ ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงไก่เป็นเหตุผลซึ่งสัมพันธ์กันนั่นคือ *Salmonella typhimurium* ไม่สามารถเจริญได้ในลำไส้ไก่ที่มี *Lactobacillus* spp. เจริญตั้งรกรากอยู่ก่อน ภาวะนี้เรียกว่า Compettitive inhibition (Lioyd, 1977) ดังนั้นจึงพอสรุปได้เบื้องต้นว่า ควรจะให้ไก่ได้รับ *Lactobacillus* spp. ตั้งแต่แรกเกิด เพื่อที่จะได้ทำให้ *Lactobacillus* spp. กลายเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น

รูปถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนของกลุ่มทดสอบโพรไบโอติก (P), P/H_2O, P_0/S P_3/S, P_6/S และ P_{12}/S (การทดลอง 4.10 รูปที่ 4.21-4.28) พบว่าเมื่อไก่มีอายุมากขึ้นความหนาแน่นของแบคทีเรียที่พบจะมากขึ้นตามและรูปร่างลักษณะส่วนใหญ่เป็นแท่งซึ่งน่าจะเป็น *Lactobacillus* spp. แบบผสมที่ให้ไก่กิน ยืนยันความน่าจะเป็นโดยการตรวจนับจำนวนของ *Lactobacillus* spp. (ตารางที่ 4.13)

สำหรับการนับจำนวน *Lactobacillus* spp. (ตามตารางที่ 4.13) ของกลุ่มทดสอบ P_3/S, P_6/S และ P_{12}/S ถึงแม้ทั้ง 3 กลุ่มทดสอบจะมีความถี่ของการให้ *Lactobacillus* spp. ต่างกันก็ตามแต่เมื่อดูผลการตรวจนับจำนวนตัวอย่าง เช่น วันที่ 5 กลุ่มทดสอบ P_3/S, P_6/S และ P_{12}/S จะพบจำนวนเซลล์ดังนี้ คือ 9.2×10^4 เซลล์/กรัมลำไส้ไก่, 7.2×10^5 เซลล์/กรัมลำไส้ไก่, 8.9×10^5 เซลล์/กรัมลำไส้ไก่ ตามลำดับซึ่งเมื่อมองภาพรวมๆ พบว่าไม่แตกต่างกันและเมื่อติดตามไปจนสิ้นสุดการทดลองวันที่ 25 ปรากฏว่าจำนวนของ *Lactobacillus* spp. จะพบในจำนวนใกล้เคียงกันทั้ง 3 กลุ่มทดสอบ ส่วนผลการนับจำนวน *Lactobacillus* spp. พบว่าการให้ไก่กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสมในวันแรกของการเลี้ยงเป็นสิ่งที่สำคัญที่สุดเพราะวันแรกๆของการเลี้ยงจำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นยังมีจำนวนน้อยมาก การที่ให้กิน *Lactobacillus* spp. แบบผสม แบคทีเรียจะสามารถเข้าไปครอบครองพื้นที่ของผนังลำไส้ในการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนเจริญในลำไส้ไก่ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.13 : Total viable cell count ของ แบคทีเรียประจำถิ่น, *Lactobacillus* spp. และ *Salmonella typhimurium* ในระบบทางเดินอาหารของไก่ โดยวิธี spread plate

กลุ่มทดสอบ	อายุของไก่ (วัน) เซลล์/กรัมลำไส้ไก่						ชนิดของแบคทีเรียที่พบ
	1	5	10	15	19	25	
ควบคุม	2.5×10^{2}	4×10^{5}	8.3×10^{8}	5.4×10^{9}	3.1×10^{9}	1.7×10^{9}	แบคทีเรียประจำถิ่น
	NF	NF	NF	NF	4.5×10^{2}	3.2×10^{3}	*Lactobacillus* spp.
โพรไบโอติก	-	5×10^{7}	7.6×10^{7}	1.6×10^{8}	9.1×10^{10}	4.5×10^{9}	แบคทีเรียประจำถิ่น
	-	4.8×10^{4}	9.6×10^{5}	6.3×10^{5}	7.2×10^{6}	2.6×10^{6}	*Lactobacillus* spp.
P/H_2O	-	9.2×10^{5}	1.2×10^{6}	7×10^{8}	1.8×10^{9}	7.3×10^{9}	แบคทีเรียประจำถิ่น
	-	3.4×10^{2}	4.3×10^{3}	2.5×10^{4}	3.3×10^{4}	3.6×10^{4}	*Lactobacillus* spp.
S/H_2O	-	7.8×10^{6}	6.6×10^{8}	5.8×10^{9}	5.4×10^{9}	2.2×10^{10}	แบคทีเรียประจำถิ่น
	-	NF	NF	NF	NF	3.2×10^{2}	*Lactobacillus* spp.
	-	2.5×10^{5}	3.5×10^{3}	6.3×10^{2}	7.6×10^{2}	4.2×10^{3}	*S. typhimurium*
P_0/S	-	8.7×10^{6}	7.5×10^{8}	8.1×10^{9}	9.5×10^{9}	3.7×10^{9}	แบคทีเรียประจำถิ่น
	-	6.1×10^{3}	9.6×10^{5}	3.2×10^{5}	4.6×10^{5}	8.6×10^{5}	*Lactobacillus* spp.
	-	3.7×10^{2}	NF	NF	NF	NF	*S. typhimurium*
P_3/S	-	1.5×10^{6}	7.5×10^{8}	8.5×10^{9}	5.6×10^{9}	5.2×10^{11}	แบคทีเรียประจำถิ่น
	-	9.2×10^{4}	6.4×10^{6}	7.8×10^{6}	1.5×10^{5}	2.2×10^{7}	*Lactobacillus* spp.
	-	NF	NF	NF	NF	NF	*S. typhimurium*
P_6/S	-	2.4×10^{7}	4.1×10^{8}	4.7×10^{9}	7.8×10^{8}	9.4×10^{10}	แบคทีเรียประจำถิ่น
	-	7.2×10^{4}	3.5×10^{6}	9.6×10^{6}	3.3×10^{6}	2.8×10^{7}	*Lactobacillus* spp.
	-	-	NF	NF	NF	NF	*S. typhimurium*
P_{12}/S	-	9.7×10^{5}	6.4×10^{7}	1.7×10^{8}	5.0×10^{10}	6.1×10^{12}	แบคทีเรียประจำถิ่น
	-	8.9×10^{3}	2.4×10^{4}	3.9×10^{5}	2.0×10^{6}	1.4×10^{7}	*Lactobacillus* spp.
	-	-	-	NF	NF	NF	*S. typhimurium*

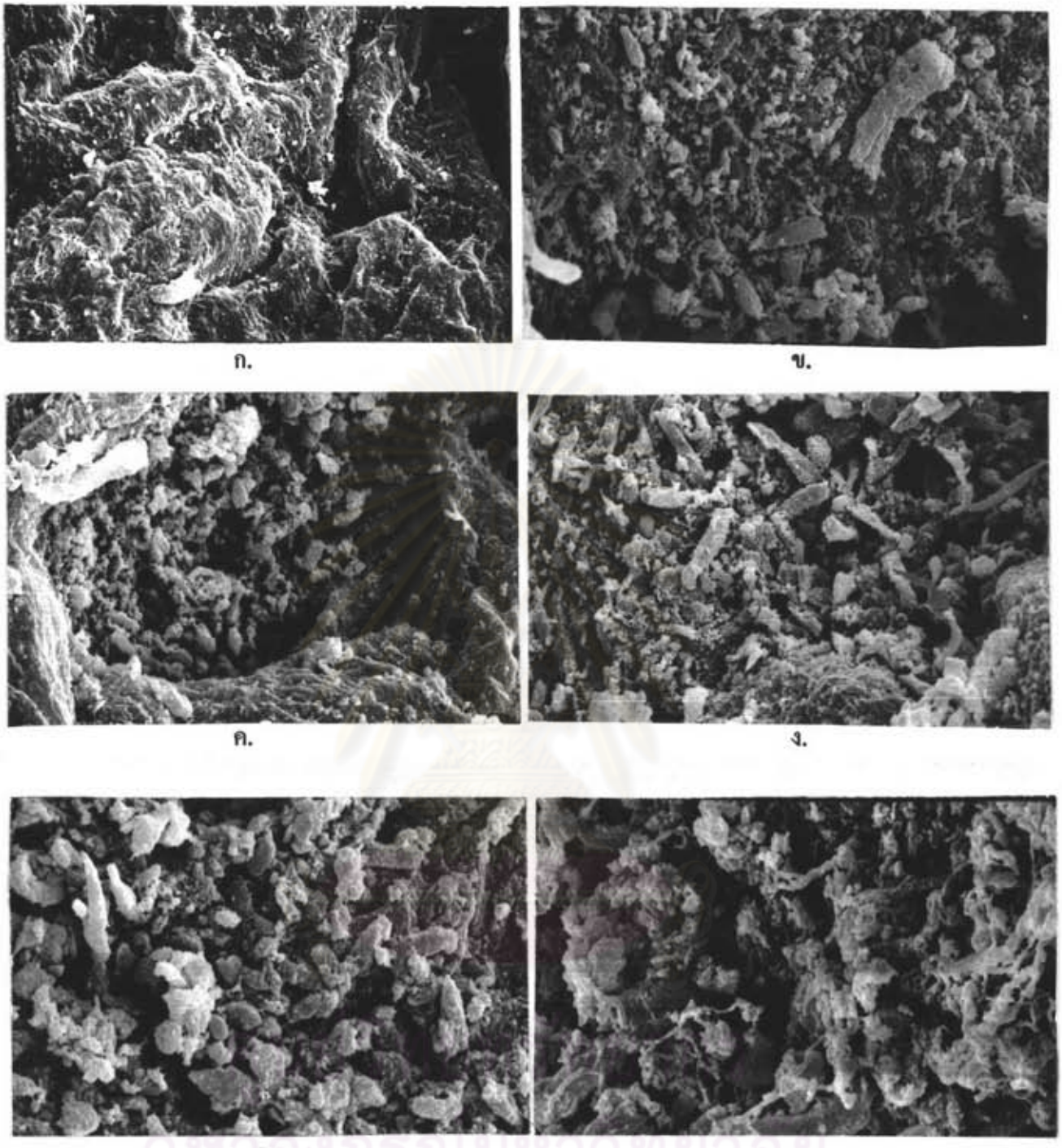
ภาวะการเลี้ยง : อาหารเลี้ยงใช้แบคทีเรียประจำถิ่น BHI Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

: อาหารเลี้ยง *Lactobacillus* spp. ใช้ MRS Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง

: อาหารเลี้ยง *S. typhimurium* ใช้ SS Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เครื่องหมาย - : ไม่ได้ทดสอบเนื่องจากไก่ที่ใช้ทดสอบมีพ่อแม่พันธุ์เดียวกันจึงใช้ไก่กลุ่มควบคุมเป็นตัวแทน

NF : Not Found

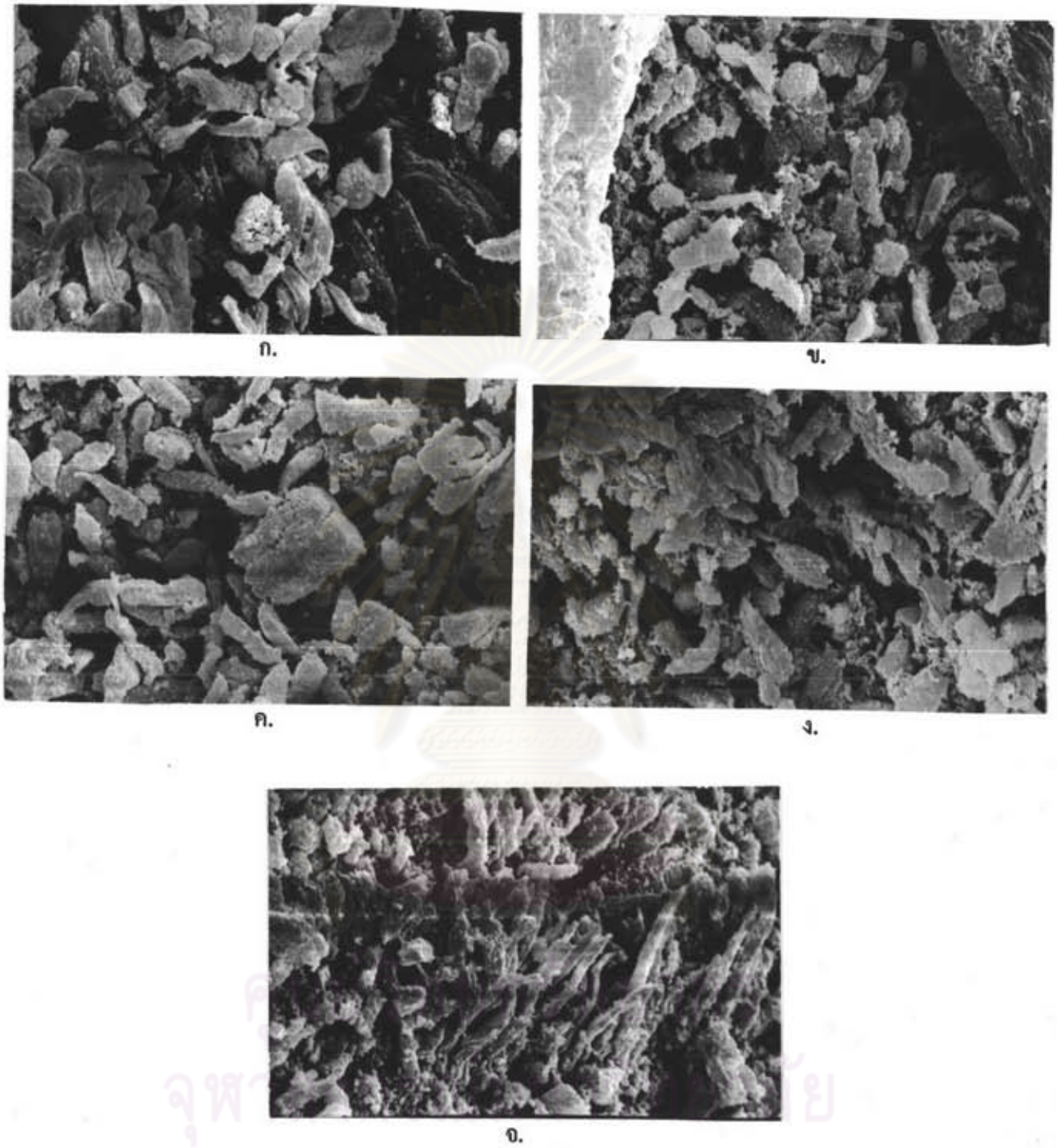


ก. ข.

ค. ง.

จ. ฉ.

รูปที่ 4.21 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่กลุ่มควบคุม (Control) ก. อายุ 1 วัน กำลังขยาย 1,800 เท่า ข. อายุ 5 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่ า ค.อายุ10 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า ง.อายุ 15 วัน กำลังขยาย 1,100 เท่า จ. อายุ 19 วัน กำลังขยาย 1,800 เท่า ฉ. อายุ 25 วัน กำลังขยาย 1,800 เท่า



ก.

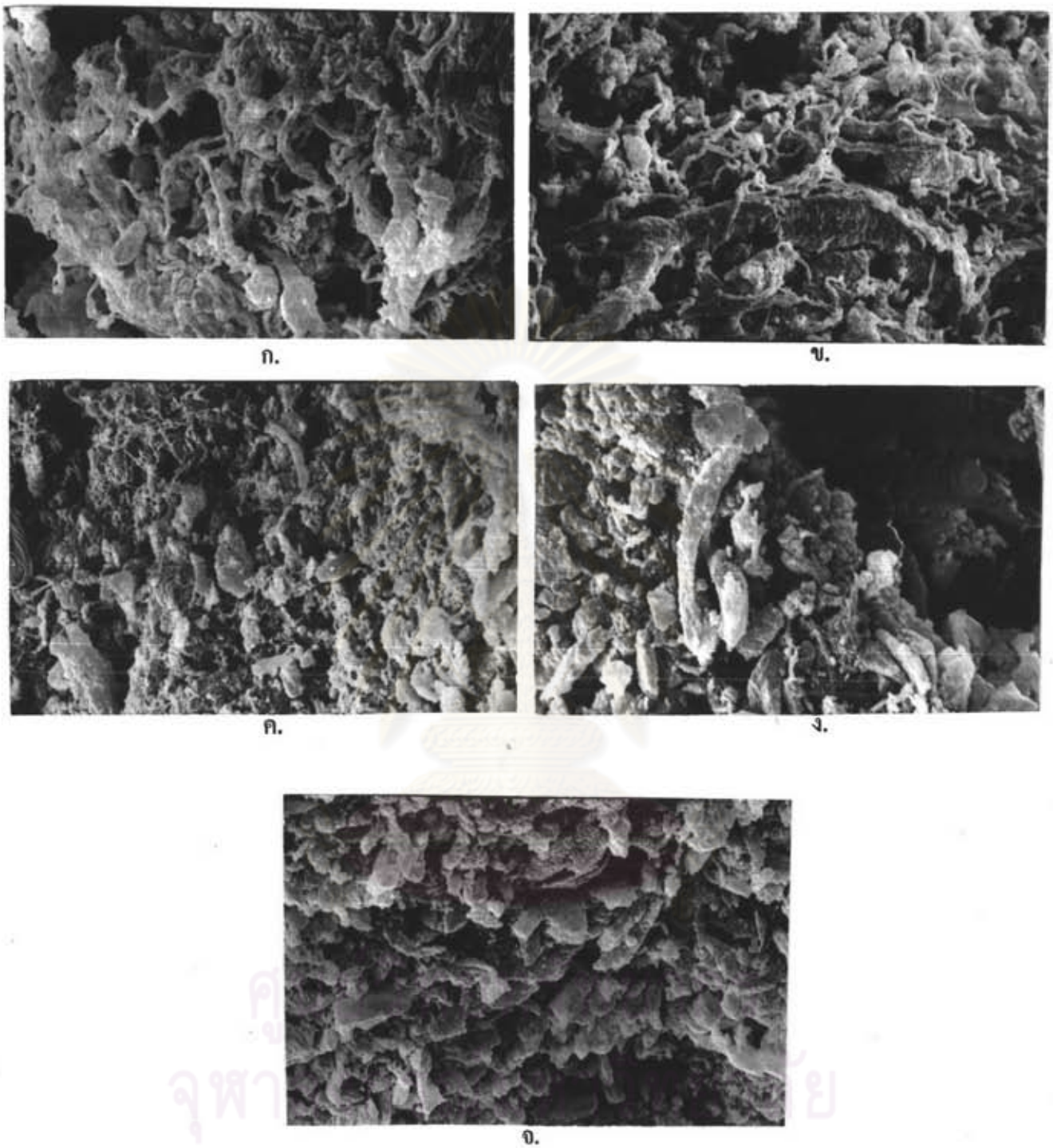
ข.

ค.

ง.

จ.

รูปที่ 4.22 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่กลุ่มทดสอบ โพรไบโอติก (P) ก. อายุ 5 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า ข. อายุ 10 วัน กำลังขยาย 1,600 เท่า ค. อายุ15 วัน กำลังขยาย 1,600 เท่า ง. อายุ 19 วัน กำลังขยาย 1,600 เท่า จ. อายุ 25 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า



ก.

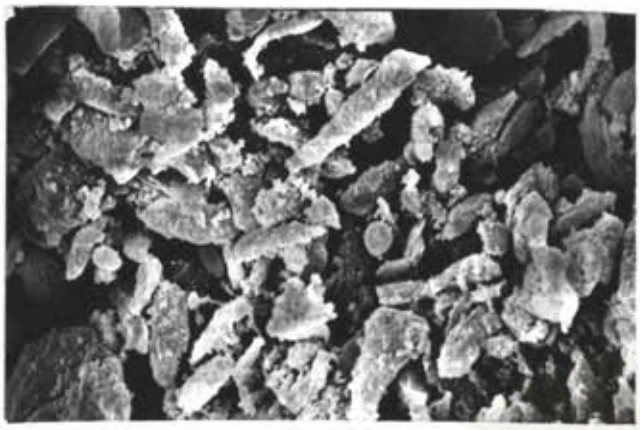
ข.

ค.

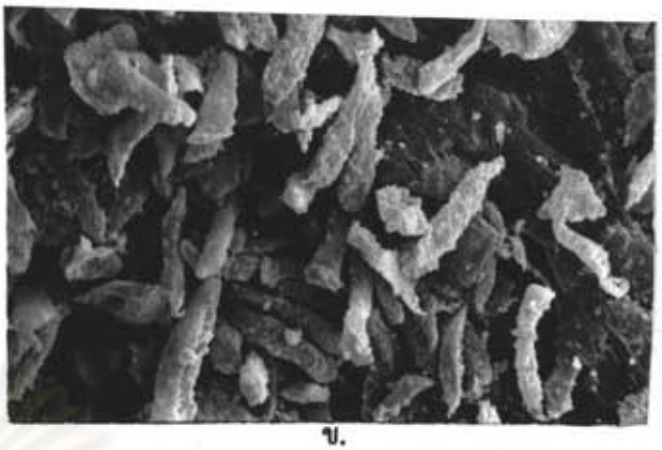
ง.

จ.

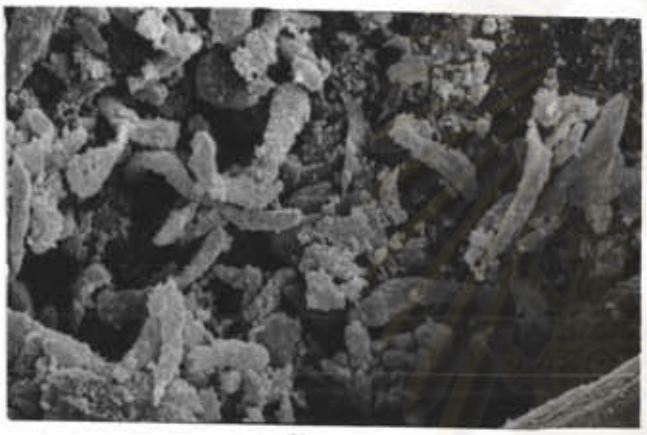
รูปที่ 4.23 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่กลุ่มทดสอบ S/H_2O ก. อายุ 5 วัน กำลังขยาย 1,800 เท่า ข. อายุ 10 วัน กำลังขยาย 1,800 เท่า ค. อายุ 15 วัน กำลังขยาย 1,800 เท่า ง. อายุ 19 วัน กำลังขยาย 1,800 เท่า จ. อายุ 25 วัน กำลังขยาย 1,800 เท่า



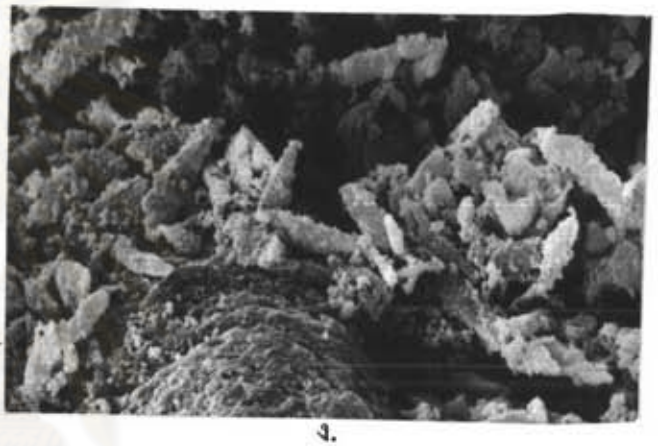
ก.



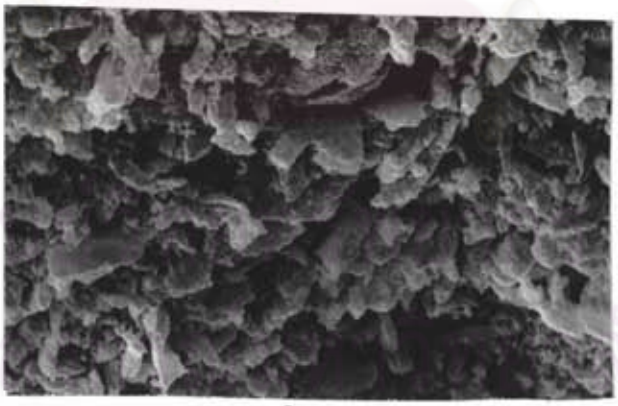
ข.



ค.

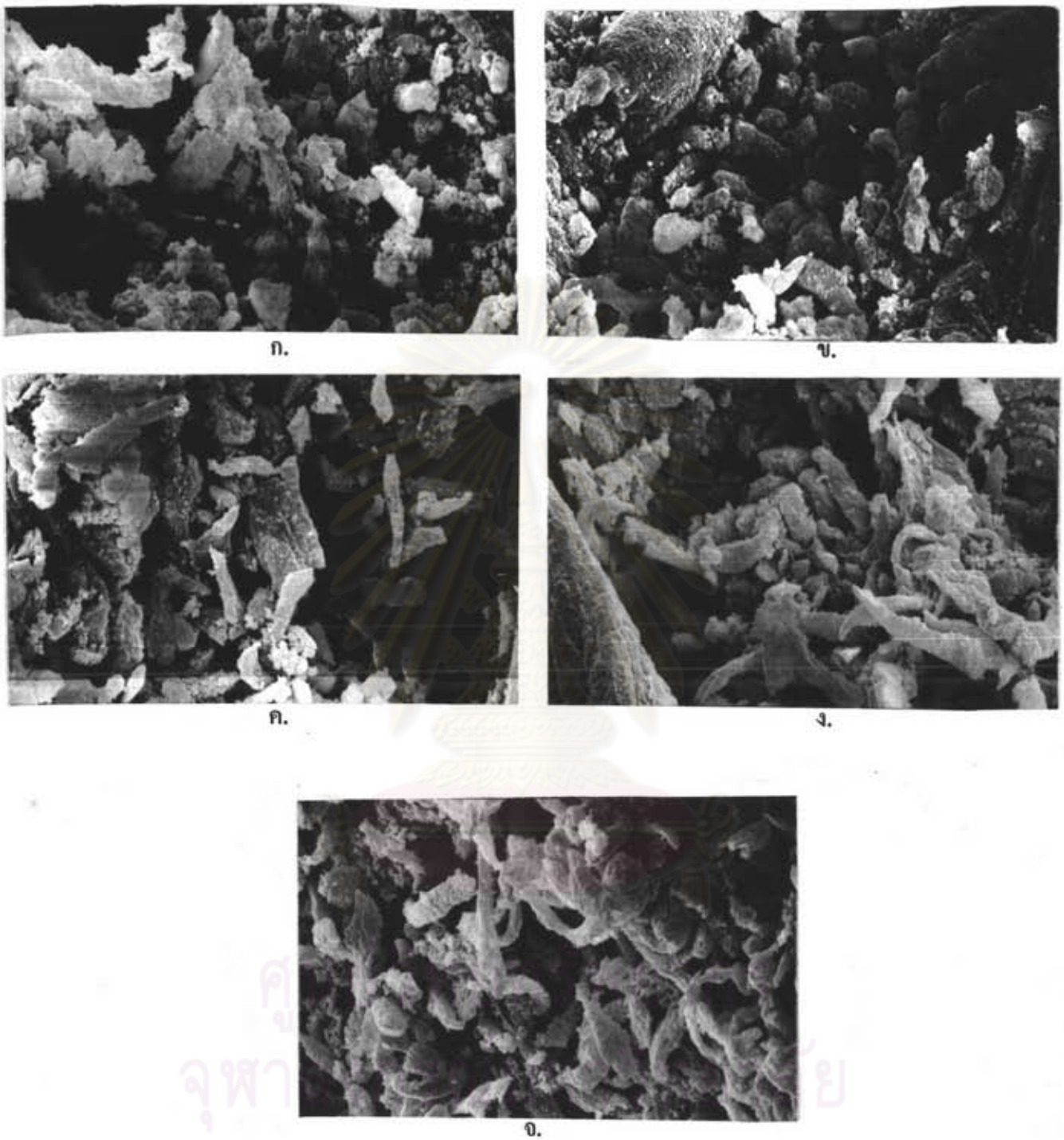


ง.



จ.

รูปที่ 4.24 แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่กลุ่มทดสอบ P/H_2O ก. อายุ 5 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า ข. อายุ 10 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า ค. อายุ 15 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า ง. อายุ 19 วัน กำลังขยาย 1,600 เท่า จ. อายุ 25 วัน กำลังขยาย 1,600 เท่า



ก. ข. ค. ง. จ.

รูปที่ 4.25 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่กลุ่มทดสอบ P_0/S ก. อายุ 5 วัน กำลังขยาย 1,800 เท่า ข. อายุ 10 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า ค. อายุ 15 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า ง. อายุ 19 วัน กำลังขยาย 1,600 เท่า จ. อายุ 25 วัน กำลังขยาย 1,600 เท่า

ก.

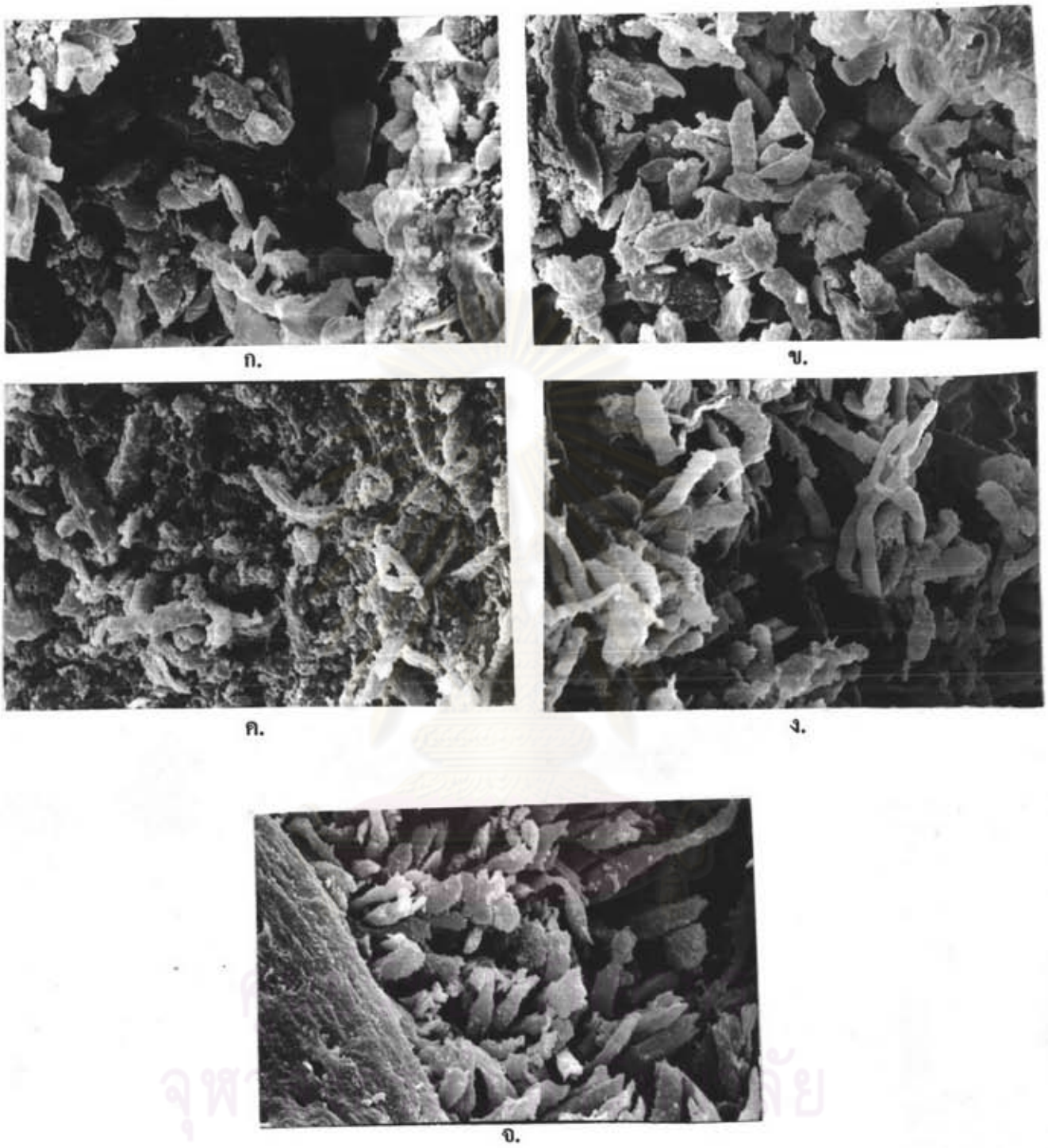
ข.

ค.

ง.

จ.

รูปที่ 4.26 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่กลุ่มทดสอบ P_3/S ก. อายุ 5 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า ข. อายุ 10 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า ค. อายุ 15 วัน กำลังขยาย 1,600 เท่า ง. อายุ 19 วัน กำลังขยาย 1,600 เท่า จ. อายุ 25 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า



ก.

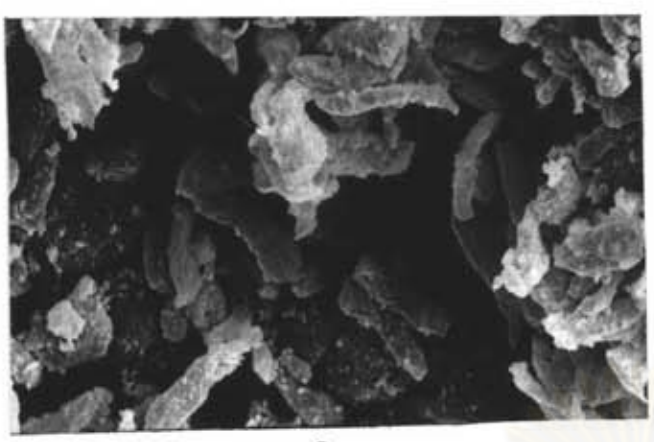
ข.

ค.

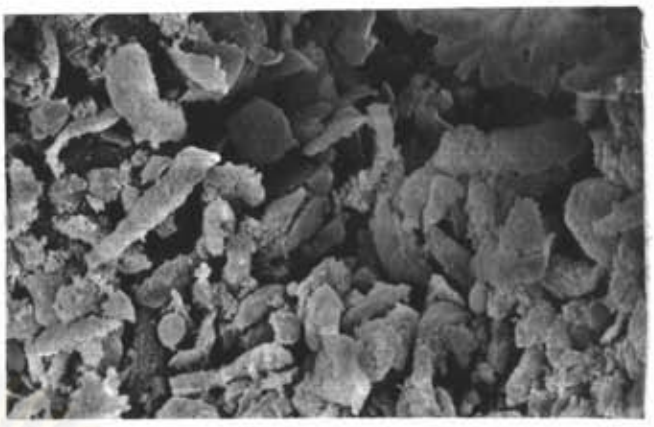
ง.

จ.

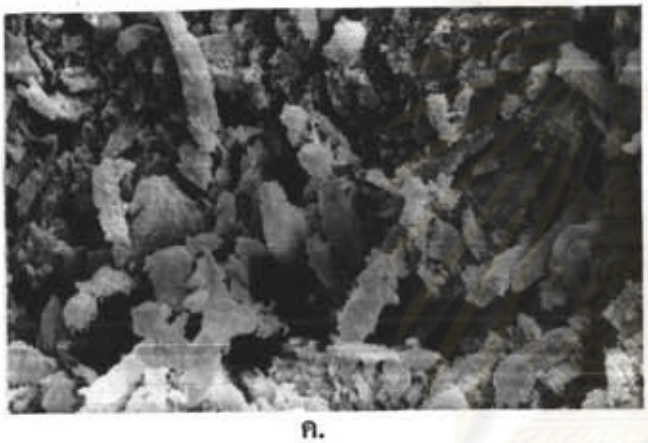
รูปที่ 4.27 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่กลุ่มทดสอบ P_d/S ก. อายุ 5 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า ข. อายุ 10 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า ค. อายุ 15 วัน กำลังขยาย 1,600 เท่า ง. อายุ 19 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า จ. อายุ 25 วัน กำลังขยาย 1,600 เท่า



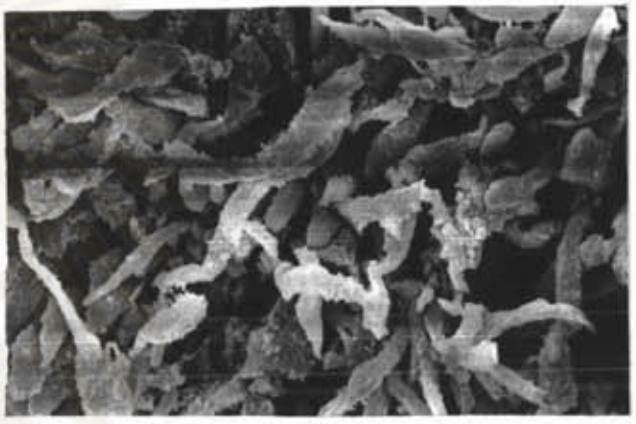
ก.



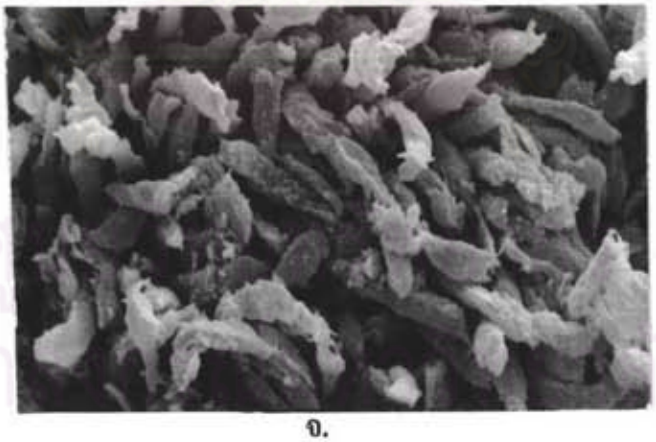
ข.



ค.



ง.



จ.

รูปที่ 4.28 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM) ของผนังด้านในลำไส้ไก่กลุ่มทดสอบ P_{12}/S ก. อายุ 5 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า ข. อายุ 10 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า ค. อายุ 15 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า ง. อายุ 19 วัน กำลังขยาย 1,500 เท่า จ. อายุ 25 วัน กำลังขยาย 1,600 เท่า