การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลสัตว์เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมและการประยุกต์ใช้ในไก่

ปริญญานิพนธ์

ของ

กาญจนา เรืองยศจันทนา

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มีนาคม 2556

การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลสัตว์เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมและการประยุกต์ใช้ในไก่

ปริญญานิพนธ์

ของ

กาญจนา เรืองยศจันทนา

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มีนาคม 2556

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลสัตว์เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมและการประยุกต์ใช้ในไก่

บทคัดย่อ

ของ

กาญจนา เรืองยศจันทนา

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มีนาคม 2556

กาญจนา เรืองยศจันทนา. (2556). *การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลสัตว์เพื่อนำมาใช้เป็นโปร-ไบโอติกสายพันธุ์ผสมและการประยุกต์ใช้ในไก่* . ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ . คณะกรรมการควบคุม : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, อาจารย์ ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย.

โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งเมื่อนำเข้า าสู่ร่างกายในปริมาณที่เหมาะสม จะส่งผลให้โฮสต์มีสุขภาพดี โดยโปรไบโอติกที่ใช้อาจเป็นแบคทีเรียแบบสายพันธุ์เดี่ยว หรืออาจเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ผสม ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นหนึ่งในก ลุ่มโปรไบโอติกที่สำคัญ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจาก ตัวอย่างอุจจาระจากสัตว์ ได้แก่ วัว หมู ไก่และเป็ด ในฟาร์ม ต่างๆ จำนวน 150 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 81 ไอโซเลต นำแบคทีเรียเหล่านี้ไปคัดเลือกโดยใช้คุณลักษณะของโปรไบ โอติก ที่ดี โดยทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่ามีเชื้อ 61 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* มีเชื้อ 43 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง เชื้อ *Salmonella* sp. มีเชื้อ 59 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มีเชื้อ 78 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง เชื้อ *Shigella* sp. และมีเชื้อ 79 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Klebsiella* sp. จากการทดสอบการเจริญในสภาวะที่ไม่เหมาะสม พบว่าไอโซเลตส่วนใหญ่ที่แยกได้สามารถทนต่อน้ำดี 1.0% และสามารถทนต่อ pH 3.5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากการ ทดสอบความ ความมีข้ว –ไม่มีข้ว เพื่อบ่งชี้การเกา ะติดลำไส้พบว่า 12 ไอโซเลต สามารถเกาะติดลำไส้ได้ดีมาก จากนั้น คัดเลือก 6 ไอโซเลต คือ K16, P6, P8, P25, P30 และ P31 จากการทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกที่ดี มาทำการ จัดจำแนก โดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA พบว่าไอโซเลต K16, P8 และ P30 มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. reuteri* ไอโซเลต P25 มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. paraplantarum* และไอโซเลต P6 และ P31 มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. plantarum* จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติก 3 สายพันธุ์ซึ่งต่างสปีชีส์กันและมีความโดดเด่นในคุณสมบัติต่างๆ คือ *Lb. plantarum* P6, *Lb. paraplantarum* P25 และ *Lb. reuteri* P30 มาศึกษาการอยู่ร่วมกัน พบว่าสามารถอยู่ร่วมกันได้โดยไม่ยับยั้งกันเอง และศึกษาความสามารถในการเกาะติดลำไส้โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงพบว่าสามารถเกาะติดเซลล์เพาะเลี้ยงได้ดีมาก จึงนำมาศึกษาการมีชีวิตในอาหารไก่เนื้อโดย ผสมในรูปเชื้อสดพบว่าปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีชีวิต ทุกสายพันธุ์ลดลงถึง 10^7 CFU/g หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 3 วัน จึงเลือกในระยะเวลา ไม่เกิน 3 วันมาทดลองในภาคสนาม โดยใช้ไก่เนื้อพันธุ์ Ross308 ที่มีการให้อาหารผสมโปรไบโอติก พบว่าการให้อาหารผสมโปรไบโอติกจะไม่มีผลแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อน้ำหนักของไก่เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ($p > 0.05$) ในทางกลับกัน อาหารผสมโปรไบโอติกสามารถเพิ่มจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก และลดจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มและ *Salmonella* sp. ในอุจจาระไก่ได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ($p < 0.05$)

SCREENING OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM ANIMAL FECES FOR MULTISTRAINS PROBIOTICS AND THEIR APPLICATION IN CHICKENS

AN ABSTRACT

BY

KANJANA RUEANGYOTCHANTHANA

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Master of Science Degree in Biotechnology

at Srinakharinwirot University

March 2013

Kanjana Rueangyotchanthana. (2013). *Screening of lactic acid bacteria isolated from animal feces for multistrains probiotics and their application in chickens*. Master thesis, M.Sc. (Biotechnology). Bangkok: Graduate school, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Asst. Prof. Dr. Onanong Pringsulaka, Dr. Nuttika Suwannasai.

Probiotics have been defined as "live microbial food supplements which beneficially affect the host by improving the intestinal microbial balance". Probiotics can be composed of monostrain and multistrain microorganisms. Lactic acid bacteria (LAB) of intestinal origin are considered to be the major source of probiotics. The aim of this research was to screen and to evaluate some probiotic properties of lactic acid bacteria strains isolated from 150 animal fecal samples such as cow, pig, chicken and duck. For this purpose, 81 isolates were employed to test for antimicrobial activity, tolerance to bile-salt and acid, potential adhesion to cell surface and *in vitro* adhesion assays. The results on the antimicrobial activity against pathogenic bacteria showed that out of 81 (eighty-one), 61 isolates, 59 isolates, 43 isolates, 78 isolates and 79 isolates produced antimicrobial activity against *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. and *Kiebsiella* sp., respectively. Most isolates were tolerant to 1.0% bile-salts and able to survive at pH 3.5 for 3 hours. The twelve isolates were then evaluated on their high hydrophobic character. Six isolates, with probiotic properties were selected. The results of identification by sequence analysis of 16S rDNA showed that isolates K16, P8 and P30 were identified as *Lb. reuteri,* P25 were identified as *Lb. paraplantarum* and both P6 and P31 the closest homology to *Lb. plantarum*. The coexistence test by cross-streak assay. No antagonism against each other was observed on MRS agar. The adhesion ability of the isolates was tested using the Caco-2 cells. All the strains demonstrated the ability to adhere to Caco-2 cells. In the animal feeding trial, the number of intestinal lactobacilli decreased after mixture for 3 days. When using field experiments with broiler breeder Ross308 probiotic strains for feed, there here was no effect on the weight of the chicken. However,it was found that the number of lactic acid bacteria was increased but the number of coliform bacteria and *Salmonella* sp., in chicken feces were decreased.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลสัตว์เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมและการประยุกต์ใช้ในไก่

ของ

กาญจนา เรืองยศจันทนา

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมชาย สันติวัฒนกุล)

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. 2556

คณะกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์

.....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน

(อาจารย์ ดร.ศิรพรรณ สุคนธสิงห์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย
จาก
ทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์สำหรับนิสิตในระดับบัณฑิตศึกษา
จากงบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2556

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จ ได้ ด้วยดี เพราะผู้วิจัยได้รับ ความกรุณาอย่างยิ่ง จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ดร.ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ร่วม ผู้ที่ทุ่มเทให้ความช่วยเหลืออย่างเต็มที่ เสียสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้ คำปรึกษาและคำแนะนำ ทั้งในด้านการศึกษา และการจัดทำวิจัยมาโดยตลอด อีกทั้งยังค่อยตักเตือน สั่งสอน แนะนำทั้งในด้านวิทยาการ ความรู้ จริยธรรมประกอบการทำปริญญานิพนธ์ที่สมบูรณ์ ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ขจีนาฏ โพธิเ วชกุล รองศาสตราจารย์ ดร.ปรินทร์ ชัยวิสุทธางกูร ดร.พิชาภัค สมยูรทรัพย์ ดร.สุขุมาภรณ์ สุขขุม ดร.ประวัติ อังประภาพรชัย และคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดการศึกษา ทำให้ผู้วิจัยนำความรู้มา ประยุกต์ใช้ในการจัดทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. รมิดา วัฒนโภคาสิน อาจารย์คณะแพทยศาสตร์ และ คุณธเนศ โสภณนิธิประเสริฐ ที่คอยให้ความรู้ คำปรึกษา รวมถึงอุปกรณ์ที่จำเป็นต่อการวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พรรณระพี อำนวยสิทธิ์ อาจารย์คชรัตน์ ทองฟัก และ อาจารย์อรรถพล ตันไสว อาจารย์คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี ราชมงคลล้านนา จังหวัดพิษณุโลก ที่ให้ความกรุณาผู้วิจัย โดยการ เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และ อุปกรณ์ต่างๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ในการทำวิจัย และแนะนำเรื่องต่างๆ ต่อการวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ศิรพรรณ สุคนธสิงห์ ที่กรุณารับเป็นประธานการสอบปริญญา นิพนธ์และช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

งานวิจัยนี้ได้รับ ทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี พ.ศ. 2556 ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ท้ายที่สุด ข้าพเจ้าขอน้อมระลึกถึงพระคุณของบิดา มารดาที่สนับสนุน ช่วยเหลือ และให้ กำลังใจข้าพเจ้า ตั้งแต่เริ่มทำปริญญานิพนธ์จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ และขอขอบคุณพี่ๆ และเพื่อนๆ ทุกคน ในเอกเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิ โรฒ สำหรับมิตรภาพ ความ ช่วยเหลือ และน้ำใจอันมีค่ายิ่ง และขอขอบคุณผู้มีพระคุณท่านอื่นๆ ที่มิได้กล่าวนามในที่นี้ที่ให้ความ ช่วยเหลือในทุกๆ ด้านจนปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี

กาญจนา เรืองยศจันทนา

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของการวิจัย	2
	ขอบเขตของการวิจัย	2
	สถานที่ทำการทดลอง	3
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	4
	แบคทีเรียกรดแลคติก	4
	โปรไบโอติก	9
3	**วิธีดำเนินงานวิจัย**	30
	อุปกรณ์และสารเคมี	30
	วิธีการดำเนินการทดลอง	31
4	**ผลการศึกษา**	41
	การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก	41
	การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก	45
	การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อที่แยกได้	49
	การจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA	60
	การทดสอบการอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือก	61
	การศึกษาความสามารถในการเกาะติดลำไส้โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง	62
	การผลิตอาหารไก่เสริมโปรไบโอติกในรูปเชื้อสด	65
	การทดสอบภาคสนาม	67
5	**สรุปและอภิปรายผลการทดลอง**	75

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ **หน้า**

บรรณานุกรม 85

ภาคผนวก..... 99

ภาคผนวก ก..... 100

ภาคผนวก ข..... 104

ภาคผนวก ค..... 106

ภาคผนวก ง..... 109

ภาคผนวก จ..... 114

ภาคผนวก ฉ..... 119

ประวัติย่อผู้วิจัย 132

บัญชีตาราง

ตาราง **หน้า**

1 ตัวอย่างของการนำโปรไบโอติกไปใช้ประโยชน์ในมนุษย์..... 14

2 ปริมาณจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสัตว์ปีก..... 24

3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง..... 30

4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 30

5 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีบริเวณใสรอบโคโลนี
บนอาหารแข็ง MRS ที่เติม $CaCO_3$..... 42

6 ลักษณะบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้..... 45

7 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค..... 49

8 แสดงความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดี..... 52

9 ผลการศึกษาความมีขั้ว-ไม่มีขั้วโดยใช้ไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้ว
เพื่อดูคุณสมบัติการเกาะติดลำไส้..... 56

10 ลักษณะบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้..... 59

11 แสดงการเกาะติดลำไส้โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง..... 63

12 ปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารไก่เนื้อ..... 66

13 เปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น..... 68

14 อุณหภูมิจากเทอร์โมมิเตอร์กระเปาะเปียกและกระเปาะแห้ง..... 70

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ **หน้า**

1 ภาพวาดตามขวางแสดงโครงสร้างและตำแหน่งที่อยู่ของเซลล์
และอวัยวะในระบบภูมิคุ้มกันบริเวณลำไส้..... 20
2 โครงสร้างของ M cell..... 21
3 โครงสร้างเยื่อบุผิวและเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันลำไส้เล็ก..... 22
4 การเพิ่มจำนวนของ IgA..... 23
5 การทดสอบการอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก..... 36
6 สภาวะโรงเรือนแบบเปิด..... 38
7 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอุจจาระสัตว์..... 41
8 บริเวณ 16S rDNA ขนาด 1,500 คู่เบส ของเชื้อ 6 ไอโซเลต จากการทำ PCR..... 61
9 การทดสอบการอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก..... 62
10 ผลการทดสอบการอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก..... 62
11 แสดงปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารไก่เนื้อ..... 67
12 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักของไก่ทั้งหมด..... 68
13 แสดงปริมาณความชื้นสัมพัทธ์..... 69
14 แสดงจำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อกรัมอุจจาระ..... 71
15 แสดงจำนวนของแบคทีเรียโคลิฟอร์มต่อกรัมอุจจาระ..... 72
16 แสดงจำนวนของแบคทีเรีย *Salmonella* sp. ต่อกรัมอุจจาระ..... 73

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

ในปัจจุบัน อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะไก่ได้มีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว เนื่องจากความต้องการของผู้บริโภคสูงขึ้น โดยในปี 2548 ที่ผ่านมาประเทศไทยมีการส่งออก เนื้อไก่แปรรูปและผลิตภัณฑ์ ประมาณ 113 ล้านกิโลกรัม คิดเป็นมูลค่าการส่งออก ถึง 13,765 ล้านบาท (คณะกรรมการบริหารสินค้าไก่เนื้อและผลิตภัณฑ์ . 2549: Online) ดังนั้นประเทศไทย จึงจำเป็นต้องมีการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตทั้งด้านกระบวนการ กรรมวิธี และคุณภาพตั้งแต่การพัฒนาอาหารสัตว์ การจัดการในฟาร์ม และอื่นๆ เพื่อให้สามารถแข่งขันด้านการส่งออกกับประเทศอื่นๆ ได้ วัตถุเสริมอาหาร (feed additives) จึงได้ถูกคิดค้นและนำมาใช้ประโยชน์ ในด้านการเลี้ยงไก่ อย่างแพร่หลาย เช่น สารกันเชื้อรา สารกันหืน สารเคมี และสารปฏิชีวนะต่างๆ (ชรินทร์ เขียวจรัส. 2539: 23-37) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารปฏิชีวนะได้ถูกนำมาใช้ในระดับ บต่ำ (20-50 ppm) เพื่อเร่งการเจริญ ทำให้สัตว์มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น และเพื่อป้องกันการติดเชื้อในช่วงที่สัตว์อยู่ในสภาวะไวต่อการติดเชื้อ (Gustafson; & Bowen. 1997: 531-541) อย่างไรก็ตามสัตว์ที่ได้รับสารปฏิชีวนะในระดับต่ำเป็นเวลานาน จะส่งผลให้มีการพัฒนาของเชื้อ ดื้อยาขึ้นในลำไส้ นอกจากนี้อาจพบการตกค้างของสารปฏิชีวนะซึ่งส่งผลเสียต่อผู้บริโภค และยังพบอีกว่าช่วงสิบปีที่ผ่านมาพบปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น (Kastner; et al. 2006: 145-155) รวมทั้งพบปัญหาการตกค้างของสารปฏิชีวนะในเนื้อและผลิตภัณฑ์จากเนื้อจากการใช้ยาในระดับที่สูงกว่า ปริมาณที่กำหนด นอกจากนี้การใช้สารปฏิชีวนะยังทำให้กลไกการต้านทานโรคของโฮสต์ (host) ล้มเหลว ในหลายประเทศโดยเฉพาะประเทศใน กลุ่มสหภาพยุโรปได้ยกเลิกการใช้สารปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์แล้ว ประเทศไทยในฐานะประเทศผู้ผลิตและส่งออกสินค้าเกษตรรายใหญ่ของโลกประเทศหนึ่ง จึงจำเป็นต้องตระหนักถึงมาตรการหรือการปรับปรุงกระบวนการเพาะเลี้ยงสัตว์ที่หลีกเลี่ยงการใช้สารปฏิชีวนะที่ก่อให้เกิดปัญหาดังกล่าว

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรีย ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก (probiotic) กล่าวคือเป็นกลุ่มที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยเมื่อนำมาใช้ในอาหาร (GRAS: Generally Regarded As Safe) และมีประโยชน์เมื่อได้รับเข้าไปในร่างกาย ในปริมาณที่เหมาะสม โดยโปรไบโอติกที่ใช้อาจเป็นแบคทีเรียแบบสายพันธุ์เดี่ยว หรืออาจเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ผสม (multistrain) ที่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อม ภายในระบบทางเดินอาหารได้ดี ซึ่งเป็นสภาวะ ที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ได้แก่ การทนต่อเกลือน้ำดี ทนต่อ pH ต่ำ และสามารถเจริญและยึดเกาะในลำไส้ ได้ ดังนั้น ในการคัดเลือก

เชื้อจึงจะต้องศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้น ได้แก่ ความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี ทนต่อ pH ต่ำ (Morgensen; et al. 2002: 10-18) และสามารถยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell) ของลำไส้ได้ นอกจากนี้จะต้องศึกษาคุณสมบัติในด้านการเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ (functional properties) ซึ่งได้แก่ การผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค การลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในทางเดินอาหารของสัตว์ การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน การลดระดับคลอเลสเตอรอลในเลือด การต่อต้านมะเร็ง และ การรักษาความผิดปกติจากการอักเสบหรือภูมิแพ้ จากประโยชน์ของโปรไบโอติกที่ได้กล่าวมาข้างต้น จึงได้มีผู้ทำการศึกษา เกี่ยวกับ การคัดเลือกโปรไบโอติกและการนำโปรไบโอติกไปใช้ทั้งในมนุษย์และสัตว์จำนวนมาก โดยจากรายงานการวิจัยส่วนใหญ่จะเน้นการใช้โปรไบโอติกสายพันธุ์เดี่ยว เนื่องจากสามารถออกแบบใน การทดลอง ได้ง่าย โดยที่ การศึกษาเกี่ยวกับการคัดเลือกโปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมยังมีน้อยมาก ซึ่งการใช้โปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมนั้นจะช่วยเพิ่มโอกาสในการยึดเกาะกับระบบทางเดินอาหารมากกว่าโปรไบโอติกสายพันธุ์เดี่ยว นอกจากนี้โปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมยังแสดงถึงประสิทธิภาพการเป็นโปรไบโอติกที่หลากหลาย ซึ่งบางคุณสมบัตินั้นจำเพาะต่อสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเท่านั้น (strain specific) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการคัดแยกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกหลายสายพันธุ์ และศึกษา ผลของการเสริมโปรไบโอติกในแบบสายพันธุ์เดี่ยวและสายพันธุ์ผสมในรูปเชื้อสดต่อการเจริญของไก่เนื้อ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพสัตว์ต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลสัตว์
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานของโปรไบโอติกที่แยกได้จาก มูลสัตว์และคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสม
3. เพื่อศึกษาผลของการเสริมโปรไบโอติกในแบบสายพันธุ์เดี่ยวและสายพันธุ์ผสมในรูปเชื้อสดต่อการเจริญของไก่เนื้อ

ขอบเขตของการวิจัย

1. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลสัตว์
2. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติพื้นฐานของจุลินทรีย์โปรไบโอติก ดังนี้
   2.1 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค
   2.2 ความสามารถในการทนกรดและน้ำดี
   2.3 ความมีขั้ว-ไม่มีขั้ว เพื่อดูคุณสมบัติการเกาะติดลำไส้

2.4 การทดสอบการอยู่ร่วมกันของเชื้อผสมที่คัดเลือก

2.5 การเกาะติดลำไส้โดยทำการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยง COLO 205

3. จัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก

4. การทดลองเสริมโปรไบโอติกในไก่เนื้อในรูปแบบเชื้อสด ทั้งแบบ การเสริมโปรไบโอติกในแบบสายพันธุ์เดี่ยวและสายพันธุ์ผสม

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ อาคาร 19 ห้อง 1301 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ อาคาร 15 ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

โรงเรือนทดลองปัญหาพิเศษ แผนกสัตว์ปีก สาขาสัตวศาสตร์และประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา จังหวัดพิษณุโลก

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. แบคทีเรียกรดแลคติก

1.1 คุณลักษณะและคุณสมบัติทั่วไป

แบคทีเรียกรดแลคติก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive bacteria) ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างทรงกลม ท่อนสั้น หรือเป็นท่อนยาว ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเพียงเล็กน้อย (microaerophile) ไม่มีไซโทโครม (cytochrome) มีปริมาณของเบส G+C น้อยกว่า 50 โมลเปอร์เซ็นต์ (mol%) ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase enzyme) แต่อาจพบการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์คะตะเลสได้ (pseudocatalase enzyme) ในสภาวะการเจริญที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำ สามารถทนต่อสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ต่ำกว่า 5 หรือที่อุณหภูมิสูงกว่า 37-40 องศาเซลเซียส รวมทั้งต้องการสารประกอบไนโตรเจนเพื่อใช้เป็นแหล่งของกรดอะมิโนและวิตามินสำหรับการเจริญและการสร้างกรดอิ นทรีย์ (Pot; et al. 1993: 513-517); (Ringo; & Gatesoupe. 1998: 177-203) เมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลคติกจำแนก ตามวิถีการหมักน้ำตาล C6 (hexose fermentation pathways) ออกเป็น 2 แบบ คือ homofermentative แบคทีเรียกรดแลคติกประเภทนี้จะเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นไพรูเวตแ ละจะเปลี่ยนต่อเป็นกรด แลคติกโดยอาศัยวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway ตัวอย่างของแบคทีเรียกรดแลคติกประเภทนี้ได้แก่ *Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus* และ *Pediococcus* เป็นต้น อีกแบบหนึ่ง คือ heterofermentative แบคทีเรียกรดแลคติกประเภทนี้จะใช้วิถี pentose phosphoketolase pathway โดยจะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดแลคติก คาร์บอนไดออกไซด์ และเอธานอล ตัวอย่างของแบคทีเรียกรดแลคติกประเภท heterofermentative ได้แก่ *Leuconostoc*, *Oenococcus* และ *Weissella* เป็นต้น (Axelsson. 1998: 1-72)

1.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก ในระยะแรกออราเจนเซน (Orla-Jensen. 1919) ได้จัดหมวดหมู่แบคทีเรียกรดแลคติก โดยอาศัยคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา รูปแบบของกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ และโครงสร้าง (configuration) ของกรดแลคติกที่สร้างขึ้น ซึ่งสามารถแบ่งแบคทีเรียกรด แลคติกออกเป็น 4 จีนัส ได้แก่ *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Streptococcus* ต่อมาได้มีการนำเอาความรู้ทางด้านสรีรวิทยา ชีวเคมี และพันธุศาสตร์มาช่วยในการจำแนกชนิดของแบคทีเรี ยกรดแลคติก เช่น องค์ประกอบของ

ผนังเซลล์ (Kandler; & Weiss. 1986: 1209-1234) ชนิดและปริมาณของกรดไขมันภายในเซลล์ (Schleifer. 1987: 201-203) ชนิดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์โดยเทคนิค SDS-PAGE (Pot; et al. 1993: 513-517) ความเหมือนกันของดีเอ็นเอ (DNA homology) (Johnson. 1984: 8-11) การศึกษารูปแบบของพลาสมิดที่อยู่ภายในเซลล์ (plasmid profile) (Josephson; & Nielsen. 1988: 219-223) ลำดับเบสของยีน ribosomal RNA (Saiki; et al. 1988: 487-494) ซึ่งจากคุณสมบัติดังกล่าวจึงทำให้สามารถ จำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกจาก 4 จีนัสข้างต้นออกเป็นจีนัสใหม่ๆ เพิ่มขึ้น เช่น จีนัส *Streptococcus* ถูกแบ่งออกเป็น 4 จีนัส คือ *Enterococcus, Lactococcus, Streptococcus* และ *Vagococcus* ส่วนสปีชีส์ *Pediococcus halophilus* ถูกแยกออกมาอยู่ในจีนัสใหม่คือ *Tetragenococcus* นอกจากนี้ยังมีการแยกจีนัส *Carnobacterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรูปร่างท่อนออกมาจากจีนัส *Lactobacillus* เป็นต้น (Stiles; & Holzapfel. 1997: 1-29) ต่อมาในปี ค.ศ. 1998 แอ็คเซลซัน (Axelsson. 1998: 1-72) ได้จัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก โดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) และลักษณะอื่นๆ ทำให้แบ่งแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็น 12 จีนัสคือ *Streptococcus (S.), Vagococcus (V.), Lactococcus (Lc.), Enterococcus (E.), Pediococcus (P.), Leuconostoc (Ln.), Lactobacillus (Lb.), Carnobacterium (C.), Aerococcus (A.), Tetragenococcus (T.), Oenococcus (O.)* และ *Weissella (W.)* โดยในจำนวนนี้พบว่า 11 จีนัส (ยกเว้น *Aerococcus*) เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งถูกระบุว่ามีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับอาหารแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละจีนัสมีลักษณะ ดังนี้

1.2.1 *Streptococcus*

เซลล์มีรูปร่างทรงกลมหรือรูปไข่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน มีการจัดเรียงตัวเป็นโซ่ยาวหรือเป็นคู่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส (homofermentative) ต้องการสารอาหารหลายชนิดในการเจริญ สามารถเจริญได้ที่อุณหภู มิ 20-40 องศาเซลเซียส พบได้ในอาหารเป็นส่วนใหญ่ นิยมใช้เป็นหัวเชื้อในอุตสาหกรรมนมหมัก ประกอบด้วย 39 สปีชีส์ มีปริมาณของเบส G+C ระหว่าง 34-46 โมลเปอร์เซนต์ (Hardie; & Whiley. 1995: 55-124)

1.2.2 *Vagococcus*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่แยกออกมาจากจีนัส *Streptococcus* เนื่องจากสามารถเคลื่อนที่ได้ประกอบ ด้วย 5 สปีชีส์ คือ *V. fluvialis, V. carniphilus, V. fessus, V. lutrae* และ *V. salmoninarum* (Al-Ahmad; et al. 2008: 235-238)

1.2.3 *Lactococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 ไมครอน มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นโซ่ยาว เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่พบได้ในผลิตภัณฑ์นมหลายชนิด ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) จากการหมักกลูโคส เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีปริมาณของเบส G+C ประมาณ 34-43 โมลเปอร์เซ็นต์ (Schleifer; & Ludwing. 1995: 7-19)

1.2.4 *Enterococcus*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีเซลล์รูปร่างคล้ายไข่ พบการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรืออาจพบเป็นโซ่สายสั้นๆ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 และน้ำดี (bile) ร้อยละ 40 เจริญได้ที่ความเป็นกรดด่าง 9.6 มีปริมาณของเบส G+C ประมาณ 37-45 โมลเปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียจีนัสนี้ประกอบด้วย 20 สปีชีส์ (Devriese; & Pot. 1995: 327-367); (Jay. 1996: 110-113); (Schleifer; & Ludwing. 1995: 7-19)

1.2.5 *Pediococcus*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียรูปร่างทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36-1.43 ไมครอน แบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน พบการจัดเรียงตัวอยู่เป็นคู่หรืออยู่เป็น 4 เซลล์ติดกันคล้ายจตุรัส (tetrad formation) เป็นพวก homofermentative ผลิตกรดแลคติกชนิด DL และ L(+) จากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารที่มีค วามซับซ้อน มักพบร่วมกับพืชที่นำมาหมัก เช่น ผักดองเค็ม นอกจากนั้นยังพบว่าบางสปีชีส์มีการปนเปื้อนในเครื่องดื่มที่หมักด้วยยีสต์ทำให้เบียร์และไวน์เสีย มีปริมาณของเบส G+C ประมาณ 34-44 โมลเปอร์เซ็นต์ (Harrigan. 1998: 346-348); (Jay. 1996: 110-113)

1.2.6 *Leuconostoc*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่พบได้ในผลิตภัณฑ์นมหลายชนิด เครื่องดื่มที่ได้จากการหมักและ ผักดองหลายชนิด ลักษณะของเซลล์มีรูปร่างทรงกลม มีการจัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นโซ่ จัดเป็นพวก heterofermentative อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริ ญอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส มักพบอยู่ร่วมกับ *Lactobacillus* sp. มีปริมาณของเบส G+C ประมาณ 38-44 โมลเปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย 15 สปีชีส์ คือ *Ln. carnosum*, *Ln. citreum*, *Ln. durionis*, *Ln. fallax*, *Ln. ficulneum*, *Ln. fructosum*, *Ln. garlicum*, *Ln. gasicomitatum*, *Ln. gelidum*, *Ln. inhae*, *Ln. kimchii*,

Ln. lactis, *Ln. mesenteroides*, *Ln. pseudoficulneum* และ *Ln. pseudomesenteroides* (Dessaet; & Steenson. 1995: 665-698); (Jay. 1996: 110-113); (Schleifer; & Ludwing. 1995: 7-19)

1.2.7 *Lactobacillus*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียกรด แลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ ลักษณะทางชีวเคมี และลักษณะทางสรีรวิทยา อันเนื่องมาจาก มีปริมาณของเบส G+C ภายในจีนัสแตกต่างกันมาก คือ ระหว่าง 32-53 โมลเปอร์เซ็นต์ (Axelsson. 1998: 1-72) เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนหรือเป็นรูปทรงรี มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรือเป็นโซ่ บางสายพันธุ์มีการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์คะตะเลส สามารถใช้เป็นโปรไบโอติกได้เป็นอย่างดี พบได้ทั่วไปในมนุษย์และสัตว์ นมและผลิตภัณฑ์นม อาหารหมักชนิดต่างๆ และเครื่องดื่ม พบในพืชเพียงเล็กน้อย เช่น หญ้าหมักและผักดอง โดยทั่วไปไม่เป็นพิษ (Harrigan. 1998: 346-348)

1.2.8 *Carnobacterium*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อนคล้าย *Lactobacillus* spp. ซึ่งก่อนหน้านี้เคยจำแนกไว้ใน *Lactobacillus* spp. เป็นกลุ่ม heterofermentative ส่วนใหญ่เจริญ ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีบางสายพันธุ์ที่สร้าง แก๊สจากการใช้น้ำตาลกลูโคส ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มี อะซิเตท (acetate) และไม่สร้างกรดโอลิอิค (oleic acid) มีปริมาณของเบส G+C ประมาณ 33-37.2 โมลเปอร์เซ็นต์ พบได้ในเนื้อสัตว์ที่บรรจุในสภาพสุญญากาศ ปลา และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก (Jay. 1996: 110-113); (Schleifer; & Ludwing. 1995: 7-19)

1.2.9 *Aerococcus*

เซลล์มีรูปร่างทรงกลมไม่มีการเคลื่อนที่ มีการแบ่งตัวแบบ 2 ระนาบ โดยทั่วไปจึงพบเซลล์อยู่เป็นคู่หรือ 4 เซลล์ เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่อยู่ใน Family Streptococcaceae สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย เป็นพวก homofermentative มีบางสายพันธุ์สร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์คะตะเลส แบคทีเรียที่พบในจีนัสนี้มี 2 สปีชีส์ คือ *A. urinae* และ *A. viridans* ซึ่งเปลี่ยนชื่อมาจาก *Pediococcus urinaeequi* และ *P. homari* ตามลำดับ (Singleton; & Sainsbury. 1988: 485-486); (Stiles; & Holzapfel. 1997: 1-29)

1.2.10 *Tetragenococcus*

มีรูปร่างทรงกลม ลักษณะการแบ่งตัวเหมือนกับ *Pediococcus* สายพันธุ์เดิม คือ *P. halophilus* อย่างไรก็ตามได้นำมาจัดจำแนกใหม่เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์สูงถึงร้อยละ 18 และมีลำดับเบสของยีน 16S rRNA ใกล้เคียงกับเชื้อในจีนัส *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าจีนัสเดิม (Simpson; & Taguchi. 1995: 125-164)

1.2.11 *Oenococcus*

มีรูปร่างทรงกลม ซึ่งถูกเปลี่ยนชื่อมาจาก *Leuconostoc oenus* เนื่องจากมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจาก *Leuconostoc* และทนต่อกรดได้ดีกว่า (Dick; Dellaglio; & Collin. 1995: 395-397)

1.2.12 *Weissella*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียกรด แลคติก จีนัสเดียวที่มีทั้งรูปร่างทรงกลม และรูปท่อน ประกอบด้วย 12 สปีชีส์ ซึ่งเดิมจำแนกอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* คือ *Weissella paramenteroides* (*Leuconostoc paramesenteroides*), *W. confusus* (*Lb. confusus*), *W. halotolerans* (*Lb. halotolerans*), *W. kandleri* (*Lb. kandleri*) และ *W. minor* (*Lb. minor*) นอกจากนี้ยังมีสปีชีส์ที่แยกได้ใหม่คือ *W. hellenica* (Stiles; & Holzapfel. 1997: 1-29), *W. thailandensis* (Tanasupawat; et al. 2000: 1479–1485), *W. cibaria* (Björkroth; et al. 2002: 141-148), *W. kimchii* (Choi; et al. 2002: 507-511), *W. soli* (Magnusson; et al. 2002: 831-834) และ *W. koreensis* (Lee; et al., 2002: 1257-1261)

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบได้ในอาหารประเภทต่างๆ เช่น เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ นม และผลิตภัณฑ์อาหารที่ผ่านกระบว นการหมัก นอกจากนี้ยังพบในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร สิ่งขับถ่ายของมนุษย์และสัตว์ รวมถึงในน้ำเสียจากแหล่งต่างๆ อีกด้วย (Pot; et al. 1993: 513-517); (Stiles; & Holzapfel. 1997: 1-29) แบคทีเรียกรดแลคติกได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียปลอดภัย (GRAS status) และมักถูกใช้ในการหมักอาหารและถนอมอาหาร ทั้งในรูปการเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในการหมักตามธรรมชาติ หรือในรูป หัวเชื้อ (starter culture) เติมลงในอาหารภายใต้ภาวะควบคุม ตัวอย่างของจีนัสที่ใช้เป็น หัวเชื้อตั้งต้นในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์นม เนื้อและผัก ได้แก่ *Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus* และ *Carnobacterium* (Stiles; & Hastings. 1991: 247-251)

2. โปรไบโอติก

2.1 คำจำกัดความของโปรไบโอติก

คำว่า โปรไบโอติก (probiotics) มาจากภาษากรีก แปลว่า “เพื่อชีวิต ” โดยมีนักวิทยาศาสตร์ ชื่อแมทนิคอฟ (Metchnikoff. 1907) เป็นผู้ให้คำจำกัดความเป็นคนแรกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1907 จากนั้นมีผู้ให้คำจำกัดความแตกต่างกัน ดังนี้

ลิลลี่และสตีลเวล (Lilly; & Stillwell. 1965: 747-748) ได้กล่าวว่า โปรไบโอติก คือ สารที่หลั่งออกมาจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง และ มีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งการทำงานจะตรงกันข้ามกับการทำงานของสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด

ปาร์คเกอร์ (Parker. 1974: 223-243) ได้ให้ความหมายว่า โปรไบโอติก หมายถึง กลุ่มของจุลินทรีย์หรือสารที่สา มารถปรับสมดุลในระบบทางเดินอาหาร ในความหมายนี้ได้รวมถึงจุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ในระบบทางเดินอาหารไว้ด้วย

ฟลูเลอร์ (Fuller. 1989: 365-378) ได้ให้ความหมายว่า โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งเมื่อมีการเสริมในอาหาร จะก่อให้เกิดประโยชน์แก่ โฮสต์ โดยช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิต

คำจำกัดความของ โปรไบโอติก ที่เป็นสากลและเป็นที่ยอมรับในปัจจุบัน คือ โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งเมื่อนำเข้าไปในร่างกายในปริมาณที่เหมาะสม จะส่งผลให้ โฮสต์มีสุขภาพดี (FAO/WHO. 2001)

2.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก

จุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติกได้ควรมีลักษณะดังต่อไปนี้

1. เป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally recognized as safe: GRAS) ต่อมนุษย์และสัตว์
2. เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างสารพิษ และไม่ก่อให้เกิดโรค (Ripamonti; et al. 2011: 1-9)
3. มีการยึดเกาะได้ดีภายในระบบทางเดินอาหาร
4. มีความสัมพันธ์เกื้อกูลหรือเป็นสายพันธุ์ชนิดเดียวกับแบคทีเรียประจำถิ่น (ปริยดา ตั๋นจักร. 2550)
5. สามารถทนกรดในกระเพาะอาหารได้ดี
6. สามารถสร้างกรดได้ดี เพื่อช่วยปรับสภาวะในทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก
7. ทนต่อน้ำดีได้ดี (Kontula; et al. 1998. 246-252)

8. เพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ที่สร้างสารที่ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

9. ช่วยให้โฮสต์มีสุขภาพดีขึ้น โดยลดการท้องผูกหรือทำให้อาการท้องผูกน้อยลง

10. มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนในระบบทางเดินอาหารได้ โดยมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นน้อย มีการรอดชีวิตสูงแม้เก็บเป็นระยะเวลานาน (Gaggìa; Mattarelli; & Biavati. 2010: S15-S28)

2.3 คุณสมบัติของจุลินทรีย์โปรไบโอติก

โปรไบโอติกเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อสัตว์ เมื่อสัตว์กินเข้าไปแล้วจะช่วยปรับสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์และยับยั้งการเจริญของเชื้อ ก่อโรค โดยจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะเกาะอยู่กับผนังลำไส้และสร้างสภาวะกรดอ่อนๆ ได้แก่ กรดแลคติก ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค และยังสามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันให้แก่ร่างกายสัตว์ ดังนั้นจึงมีการนำเอาโปรไบโอติกเสริมในอาหารสัตว์ โดยคุณสมบัติที่สำคัญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกมีลักษณะดังต่อไปนี้

2.3.1 ความสามารถในการทนต่อภาวะความเป็นกรดและเกลือน้ำดี

จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกนั้น จะต้องทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดีในระบบทางเดินอาหารได้ เนื่องจากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติกจะถูกนำมาผสมกับอาหาร เมื่อกินเข้าไปอาหารจะเคลื่อนที่ไปยังกระเพาะอาหาร ซึ่งมีน้ำย่อยหลั่งออกมาช่วยในการย่อยอาหารและทำให้ค่า pH ในกระเพาะอาหารมีค่าลดลงประมาณ 2.0-2.5 จากนั้นอาหารจะอยู่ภายในกระเพาะอาหารประมาณ 2-4 ชั่วโมง (Yin; & Zheng. 2005: 67-68) ดังนั้นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกต้องสามารถทนต่อภาวะกรดในกระเพาะอาหารได้ หลังจากนั้นอาหารจะเคลื่อนที่ไปยังลำไส้เล็ก ซึ่งมีน้ำดีเป็นองค์ประกอบ โดยน้ำดีนอกจากจะถูกปลดปล่อยออกมาจากถุงน้ำดีเพื่อช่วยในการย่อยอาหารชนิดไขมัน และดูดซึมวิตามินที่ไม่ละลายน้ำแล้ว น้ำดียังเป็นอันตรายต่อผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ในลำไส้ด้วย ดังนั้นความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี จึงเป็นอีกหนึ่งคุณสมบัติในการคัดเลือกความเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติก (Yu; & Tsen. 1993: 75) ซึ่งมีตัวอย่างวิจัยที่ใช้ความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดีเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกดังนี้

จินและคนอื่นๆ (Jin; et al. 1996: 67-71) รายงานว่าสภาวะความเป็นกรดและความสามารถในการทนต่อกรดมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากลำไส้ไก่ ได้แก่ *Lb. acidophilus* I16, *Lb. acidophilus* I26, *Lb. fermentum* I25 และ *Lb. brevis* I23 มีชีวิตอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารของไก่ ซึ่งมีค่า pH ของน้ำย่อยเท่ากับ 0.5-2.0 ได้ เนื่องจากเชื้อ *Lactobacillus*

ที่แยกได้จากลำไส้ไก่ เมื่อนำมาทดสอบในส ภาวะความเป็นกรดที่ pH 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีชีวิตรอดได้ที่ pH 0.5-2.0 และเจริญได้เมื่อปรับค่า pH ให้สูงขึ้นเป็น pH 3-5 นอกจากนี้การทนต่อเกลือน้ำดีมีผล ทำให้เชื้อ *Lactobacillus* มีชีวิตและเจริญในระบบทางเดินอาหารได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นบริเวณลำไส้ส่วนต้น ซึ่งจากการทดสอบ การเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* ในอาหาร MRS ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นนี้มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และสรุปว่าเชื้อ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากลำไส้ไก่มีคุณสมบัติทนต่อกรดและเกลือน้ำดี เมื่อเคลื่อนที่ผ่านส่วนกระ เพาะพัก (crop) กระเพาะจริง (gizzard) และลำไส้เล็กของไก่ จึงสามารถมีชีวิตอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารไก่ได้

ทอแรนโตและคนอื่นๆ (Taranto; et al. 2006: 720-725) รายงานว่าเกลือน้ำดีมีผลต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยทำให้ผนังเซลล์ยอมให้สารซึมผ่านเข้า -ออกได้ ยับยั้ งการนำกลูโคสเข้าเซลล์และมีผลต่อโครงสร้าง ในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโครงสร้างส่วนของไขมัน ทำให้โครงสร้างส่วนเยื่อหุ้มเซลล์บิดเบี้ยวผิดรูป จากการศึกษาผลของเกลือน้ำดี ชนิ ด taurodeoxycholate (TDCA) และ deoxycholate (DCA) ต่อเชื้อ *Lb. reuteri* CRL 1098 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโ ปรไบโอติก พบว่าในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี ชนิด taurodeoxycholate (TDCA) *Lb. reuteri* มีอัตราการอยู่รอดสูง เมื่อเทียบกับเชื้อ *Lactobacillus* สายพันธุ์อื่นๆ แต่ ถูกทำลายด้วยเกลือน้ำดีชนิด deoxycholate (DCA) ที่ความเข้มข้นมา กกว่า 3 mM ขึ้นไป ดังนั้นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกต้องสามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้

2.3.2 ความสามารถในการเกาะติดลำไส้

ความสามารถในการเกาะติดลำไส้ (adhesion) ของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหารเป็นอีกหนึ่งคุณสมบัติที่สำคัญ ในการคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก เนื่องจากการยึดเกาะของจุลินทรีย์โปรไบโอติกบนผนังลำไส้ในระบบทางเดินอาหาร เป็นกลไกที่ช่วยป้องกันเชื้อก่อโรค โดยจะขัดขวางการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคบริเวณรีเซฟเตอร์ (receptor) ที่ผิวเซลล์ลำไส้ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะเจริญที่ผนังลำไส้ แล้วเพิ่มจำนวนและยึดครองบริเวณรีเซฟเตอร์ดังกล่าวทำให้เชื้อก่อโรคถูกกำจัดออกไปจากระบบทางเดินอาหาร โดยปัจจัยที่ช่วยให้แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเกาะติดกับเซลล์ลำไส้ (Rosenberg; Gutnick; & Rosenberg. 1980: 29-33) ได้แก่

2.3.2.1 Surface layer protein; S-layer protein

Surface-layer หรือ S-layer เป็นองค์ประกอบชั้นนอกสุดของเซลล์ ประกอบด้วยหน่วยย่อยของโปรตีนหรือไกลโคโปรตีน เรียงตัวเป็นผลึกรูปสี่เหลี่ยม หกเหลี่ยม เชื่อมต่อกับเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ในสิ่งมีชีวิตแต่ ละชนิดจะมี S-layer แตกต่างกันและพบว่าช่วยให้เกิดการเกาะติดกับเยื่อบุผิว (epithelial cells) เมือก (mucus) หรือโปรตีนส่วนที่ถูกสร้างออกมาอยู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ (extracellular matrix; ECM proteins) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของจากาวาวิลเจียนและปาลวา (Jakava-Viljanen; & Palva. 2007: 1-27) ที่ได้ศึกษา S-layer protein ซึ่งใช้ในการเกาะติด S-layer ของเซลล์ลำไส้ ของเชื้อ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากลำไส้และ มูลสุกรในการเกาะติดต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้สุกร ลำไส้มนุษย์และต่อ ECM protein โดยคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* ที่ผนังเซลล์มี S-layer protein เป็นองค์ประกอบ จากนั้นนำเชื้อที่คัดเลือกได้มาศึกษาความสามารถในการเกาะติดกับเซลล์ลำไส้ (intestine 407 cell line) และเปรียบเทียบความแตกต่างในการเกาะติดกับเซลล์ลำไส้ระหว่างเชื้อ *Lactobacillus* LAB87 ที่ไม่มี S-layer protein ซึ่งผลการทดลองพบว่าเชื้อ *Lactobacillus* ที่ผนังเซลล์มี S-layer protein เป็นองค์ประกอบสามารถเกาะติดกับเซลล์ลำไส้ได้ ในขณะที่ *Lactobacillus* LAB87 ไม่พบการเกาะติดบนเซลล์ลำไส้ แต่พบเซลล์เดี่ยวๆ กระจายอยู่โดยรอบเซลล์ ลำไส้ แทน เมื่อเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อ *Lactobacillus* ในการเกาะติดบน EMC protein ได้แก่ ไฟโบรเนคติน (fibronectin) และลามินิน (laminin) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ เชื้อ *Lactobacillus* ที่ทำการสกัดและไม่สกัดเอา S-layer protein ออกด้วยสารกัวนิดีนไฮโดร คลอไรด์ (guanidine hydrochloride) พบว่าความสามารถในการเกาะติดของเชื้อกับไฟโบรเนคตินและลามินินจะลดลง เมื่อผนังเซลล์ไม่มี S-layer protein เป็นองค์ประกอบ

2.3.2.2 Cell surface hydrophobicity

Cell surface hydrophobicity คือ พื้นผิวเซลล์ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ โดยพื้นผิวเซลล์ส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของไขมันบริเวณพื้นผิวเซลล์จุลินทรีย์ ถ้ามีปริมาณสูงจะมีผลให้เซลล์มีความไม่ชอบน้ำสูงด้วย ในขณะที่พื้นผิวเซลล์ ส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) จะขึ้นอยู่กับปริมาณพอลิแซคคาไรด์บริเวณพื้นผิวเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งความไม่ชอบน้ำของแบคทีเรียแลคติก วัดได้โดยการทดสอบสารไฮโดรคาร์บอน (microbial adhesion to hydrocarbon test; MATH) เนื่องจากมีความเกี่ยวเนื่องกับความสามารถในการเกาะติดของเซลล์แบคทีเรีย จึงนิยมนำมาใช้วัดความสามารถในการเกาะติด เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกเบื้องต้ น ด้วย (Rosenberg; Gutnick; & Rosenberg. 1980: 29-33)

2.3.2.3 การเกาะกลุ่มกันเอง (Autoaggregation)

การเกาะกลุ่ม กันเองของแบคทีเรีย คือ การเกาะติดกันเองของเซลล์แบคทีเรีย โดยเกิดขึ้นระหว่างเซลล์ภายในสายพันธุ์เดียวกัน (autoaggregation) หรือต่างสายพั นธุ์กัน (coaggregation) มีความสำคัญในการเกาะติดของเซลล์แบคทีเรีย โดยทั่วไ ปจุลินทรีย์โปรไบโอติก จะสามารถเกาะกลุ่ม กันเองได้สูงกว่าเชื้อก่อโรค และบางสายพันธุ์พบว่าการ เกาะกลุ่มกัน เอง มีความสัมพันธ์กับความไม่ชอบน้ำของเซลล์ อย่างไรก็ตามความจำเพาะกันของเซลล์ทำให้การเกาะติดของเซลล์เกิดขึ้นสูงและสามารถจับกันเองได้สูงด้วย นอกจากนี้กลไกดังกล่าวยังเกิดขึ้นระหว่างสาร แบคทีริโอซินที่แบคทีเรีย กรดแลคติกผลิตขึ้นกับเชื้อก่อโรค ซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่ช่วยการป้องกันเซลล์ ขณะเดียวกันยังช่วยส่งเสริมให้เชื้อ เกาะติดในระบบลำไส้ได้ดีด้วย (Lahtinen; & Ouwehand. 2009) จากรายงานของ โคสและคนอื่นๆ (Kos; et al. 2003: 981- 987) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเองและคุณสมบัติในการเกาะติดของเชื้อ *Lb. acidophilus* M92 ต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้สุกร ผลการทดลองสนับสนุนว่ าความสามารถในการเกาะติดของเชื้อ บนเยื่อเมือกและเซลล์เยื่อบุผิว เกิดจากกระบวนการที่ต่อเนื่องและก่อให้เกิดการสัมผัสกันของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียและเกิดการจับกันได้เอง นอกจากนี้ โคลาโด เมอริรูโตและแซลมิเนน (Collado; Meriluoto; & Salminen. 2008: 1065-1073) รายงานว่า การจับกันเองเป็นคุณสมบัติของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ต้องการ เนื่องจากการเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์มีความสำคัญต่อการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร โดยกา รจับกันเอง ระหว่างจุลินทรีย์โปรไบโอติกและเชื้อก่อโรคจะช่วยกำจัดเชื้อก่อโรคออกจากระบบทางเดินอาหาร โดยเข้าแทนที่และปรับสมดุลเชื้อในระบบลำไส้ ปัจจัยที่มีผลต่อการจับกันเองของจุ ลินทรีย์โปรไบโอติกกับเชื้อก่อโรค ได้แก่ ความจำเพาะของสายพันธุ์ เวลาและสภาวะในการบ่มเชื้อ เนื่องจากความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเองเป็นคุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่ง และพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับพื้นผิ วเซลล์ที่ไม่ชอบน้ำ ดังนั้นการทดสอบการเกาะกลุ่ม กันเองและ การทดสอบการเกาะติดด้วยการทดสอบสารไฮโดรคาร์บอน (bacterial adhesion to hydrocarbons; BATH test) นอกจากแสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของพื้นผิวเซลล์ที่แตก ต่างของจุลินทรีย์โปรไบโอติกแล้ว ยังสามารถนำมาใช้เพื่อคัดเ ลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกเบื้องต้นได้ด้วย

2.3 ประโยชน์ของโปรไบโอติก

ในช่วงต้นของศตวรรษที่ 20 โปรไบโอติกถูกนำมาใช้ให้ เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยพบว่าโปรไบโอติกสามารถรั กษาสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ และ ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ในปัจจุบันพบว่าโปรไบโอติก ก่อประโยชน์หลายด้าน อาทิ สามารถช่วยบรรเทาอาการอักเสบของลำไส้ (Mach. 2006: 23-33) ช่วยป้องกันและรักษาผู้ป่วยที่มีอาการท้องร่ว ง (Yan; & Polk. 2006: 717-721) โดย

พบว่าอาหารที่มี การผสมโปรไบโอติกที่ประกอบด้วย แบคทีเรียกรดแลคติกส ามารถป้อ งกันการเกิดท้องร่วงเฉียบฉับพลัน สามารถลดความรุนแรงและระยะเวลาในการเกิดท้องเสียจาก rotavirus ในเด็ก รวมถึงท้องร่วงในผู้ใหญ่ที่เกิดจาก *E. coli* (Reid; et al. 2003: 658-672); (Ouwehand; Salminen; & Isolauri. 2002: 279-289) ช่วยรักษาผู้ป่วยที่ติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ (Reid. 2008: 969-975) ช่วยบรรเทาการไม่ทนต่อแลคโตส (lactose intolerance) เนื่องจาก แบคทีเรียกรดแลคติก สามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสเป็นกรดแลคติก ดังนั้น จะช่วยบรรเทาการไม่ทนต่อแลค โตสให้ลดลง (Sanders. 2000: 384S-390S) ช่วยป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ โดยพบว่าโปรไบโอติกบางสปีชีส์ เช่น *Lb. bulgaricus* มีฤทธิ์ในการต้านสารก่อมะเร็ง โดย จะไปจับ กับ heterocyclic amine ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งที่พบในเนื้อที่ปรุงสุก (Wollowski; Rechkemmer; & Pool-Zobel. 2001: 451S-455S) จากการทดลองในสัตว์พบว่า โปรไบโอติก สามารถต้านมะเร็งลำไส้ในหนูได้ ช่วยลดระดับคลอเลสเตอรอล ช่วยลดความดันโลหิต โดยจากการศึกษาทางคลินิก พบว่าการบริโภคนมหมักที่ใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจะช่วยลดความดันเลือดได้ ซึ่งอาจเกิดจากการสร้าง angiotensin-converting En3 inhibitor-like peptide ในระหว่างการหมัก (Sanders. 2000: 384S-390S) ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันและป้องกันการติดเชื้อ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะช่วยป้องกันเชื้อก่อโรคในลักษณะ แข่งขันกันในการใช้สารอาหารเพื่อการเจริญกับเชื้อก่อโรค และยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ IgA ช่วยเร่งการเกิด phagocytosis และเพิ่มอัตราส่วนของ T lymphocyte และ natural killer cell (Reid; et al. 2003: 658-672); (Ouwehand; Salminen; & Isolauri. 2002: 279-289) ตัวอย่างของการนำโปรไบโอติกไปใช้ในมนุษย์ แสดงดังตาราง 1

ตาราง1 ตัวอย่างของการนำโปรไบโอติกไปใช้ประโยชน์ในมนุษย์

ชนิดของเชื้อก่อโรคหรือสภาวะ	**เชื้อที่เป็นโปรไบโอติกที่ใช้รักษา**	**ผล**
ท้องเดิน (ติดเชื้อ)	*B. bifidum*	ปริมาณอุจจาระลดลง
ท้องเดิน (antibiotic-associated)	*B. lactis* *S. thermophilus*	ปริมาณอุจจาระลดลง และลดการเกิดโรค
Candida	*Lb. acidophilus*	บรรเทาการติดเชื้อให้ลดลง
Chlamydia	*E. faecium*	ลดการติดเชื้อ
Citrobacter rodentium	*Lb. acidophilus* *Lb. rhamnosus*	ลดการเจริญของเชื้อในลำไส้

ตาราง1 (ต่อ)

ชนิดของเชื้อก่อโรคหรือสภาวะ	เชื้อที่เป็นโปรไบโอติกที่ใช้รักษา	ผล
Giardia	*E. faecium*	ลดการติดเชื้อ
Helicobacter pylori	*Lb. acidophilus*	ลดการอักเสบ
	Lb. rhamnosus	ลดการเจริญของเชื้อ
	Lb. gasseri	
	Lb. reuteri	
Salmonella	*B. longum*	ลดการติดเชื้อ
	S. cerevisiae	
	Lb. reuteri	
Clostridium difficile	*S. cerevisiae*	ลดอัตราการตายในผู้ป่วย

ที่มา: Tannis. (2008). *Probiotic rescue*. p. 32.

การใช้โปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมนั้นมีข้อดีกว่าการใช้โปรไบโอติกสายพันธุ์เดี่ยว เนื่องจากการใช้โปรไบโอติกหลายสายพันธุ์จะช่วยในการเสริมฤทธิ์กัน โดยสปีชีส์ที่ต่างกันจะมีประโยชน์ต่อสุขภาพแตกต่างกัน เช่น *Lb. acidophilus* และ *Lb. reuteri* ออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียเช่นเดียวกัน ซึ่งจะช่วยลดเชื้อก่อโรคในลำไส้ อย่างไรก็ตาม *Lb. acidophilus* จะให้ประโยชน์แก่สุขภาพด้านอื่นด้วย ได้แก่ ความสามารถในการสร้างวิตามินเค และแลคเตส (lactase) เป็นต้น ในขณะเดียวกัน *Lb. reuteri* สามารถสร้างสารรูเทอริน (reuterin) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการรักษาการติดเชื้อจาก rotavirus และ *H. pylori* ดังนั้นการใช้โปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมจะช่วยเพิ่มประโยชน์ต่อสุขภาพ และยังช่วยเพิ่มโอกาสในการยึดเกาะกับระบบทางเดินอาหารมากกว่าโปรไบโอติกสายพันธุ์เดี่ยว นอกจากนี้โปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมยังแสดงถึงประสิทธิภาพการเป็นโปรไบโอติกที่หลากหลาย ซึ่งบางคุณสมบัตินั้นจำเพาะต่อสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเท่านั้น (strain specific) (Tannis. 2008: 32)

2.4 กลไกการทำงานของแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติก

2.4.1 การผลิตสารต้านจุลชีพ

2.4.1.1 กรดอินทรีย์ (organic acid)

กรดอินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกได้แก่ กรดแลคติกและกรดอะซิติก สำหรับกรดอะซิติกจัดเป็นสารยับยั้งที่แรงที่สุด และมีช่วงของการยับยั้งกว้าง สามารถยับยั้งได้ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย ค่า pKa ของกรดอะซิติก จะสูงกว่ากรดแลคติก (4.75 และ 3.08 ตามลำดับ) การใช้กรดทั้งสองชนิดนี้ร่วมกันสามารถลดอัตราการเจริญของ *Salmonella* Typhimurium ได้มากกว่าการใช้กรดชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว จึงกล่าวได้ว่ากรดทั้งสองมีการส่งเสริมฤทธิ์กัน (synergistic activity) (Rubin; Terasaki; & Sanui. 1978: 4379-4383) กรดอินทรีย์จะแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากความสามารถในการละลายได้ในไขมัน (Bearso; et al. 1997: 173-180) เมื่อกรดอินทรีย์เข้าไปภายในเซลล์แล้วกรดจะแตกตัวปล่อยโปรตอนเข้าไปในไซโตพลาสซึม เกิดสภาวะที่เป็นกรดทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Salmond; Kroll; & Booth. 1984: 1845) นอกจากนี้กรดอินทรีย์ จะมีผลยับยั้งกระบวน การเมแทบอลิซึม ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ ทำให้สามารถทำลายเซลล์หรือ ยับยั้งเซลล์จุลินทรีย์นั้นๆ (Fuller. 1989: 365-378) และยังพบว่าการสะสมของกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียกรดแ ลคติกสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญ ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างในช่วงแรกของการเจริญลดลง และมีผล ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ทนกรด (Mayra-Makinen; & Bigret. 1998: 73-102) อย่างไรก็ตามการิกาและคนอื่นๆ (Garriga; et al. 1998: 125-132) ได้เสนอแนะกลไกของกรดอินทรีย์ที่แตกต่างไปจากข้างต้น กล่าวคือ กลไกของกรดอินทรีย์ไม่ได้เกิดจากโปรตอนที่แตกตัวภายในเซลล์ แต่เกิดจาก การสะสมของประจุ ลบทำให้ลดอัตราการสังเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่ และมีผลกระทบต่อการเคลื่อนย้ายสารบริเวณเหนือเยื่อหุ้มเซลล์

2.4.1.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide)

ในสภาวะที่มีออกซิเจนแบคทีเรียกรด แลคติก จะสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออ กไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นตัวออกซิไดซ์ที่รุนแรงและมีผลต่อเซลล์แบคทีเรีย โดย จะออกซิไดซ์หมู่ sulfhydryl ภายในโมเลกุลโปรตีนของเซลล์และในชั้นไข มันที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Lindgren; & Dobrogosz. 1990: 149-164) ทำให้โครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนในเซลล์เป ลี่ยนไปจนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังสามารถรวมตัวกับสารประกอบอื่นเกิดเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้ เช่น ในน้ำนมดิบ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะรวมตัวกับไ ธโอไซยาเนต (SCN^-) โดยเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) เกิดเป็นไฮโปไธโอไซยาไนต์ ($OSCN^-$) ซึ่งจะมีผลในการทำลายหรือเปลี่ยนแปลง โครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของ

แบคทีเรีย ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นได้ (Kamau; Doores; & Pruitt. 1990: 2711-2716); (Bank; Broad; & Sparks. 1986: 103-147) ดังสมการ

$$SCN^- + H_2O_2 \xrightarrow{\text{lactoperoxidase}} OSCN^- + H_2O$$

2.4.1.3 คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide)

คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ส่วนใหญ่ เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซสให้เป็นกรด แลคติก แบบ heterofermentative fermentation คาร์บอนไดออกไซด์จะ เกิดการสะสมในชั้นไขมัน ทำให้คุณสมบัติในการ เป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ เสียไป (Lindgren; & Dobrogosz. 1990: 149-164) คาร์บอนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงๆ สามารถป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้

2.4.1.4 ไดอะซิติล (diacetyl)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างไดอะซิติล (2,3-butanedione) ได้แก่ *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Streptococcus* (Jay. 1982: 525-532) โดยไดอะซิติล สามารถ ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และราได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก กลไกการยับยั้งของไดอะซิติลคาดว่าเกิดจากการทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนอาร์จีนีนที่เป็นองค์ประกอบโปรตีนหรือเอนไซม์ (Ouwehand. 1998: 139-159) โดยพบว่าไดอะซิติล (300 ppm) มีผลในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค *E. coli* 0157:H7 และ *Salmonella* Typhimurium ในระหว่างการหมักเนื้อได้ (Kang; & Fung. 1999: 975-979)

2.4.1.5 รูเทอริน (reuterin)

รูเทอรินที่มีการศึกษา มากพบว่าสร้างมาจาก *Lb. reuteri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ เชื้อชนิดนี้ สามารถ เจริญ ได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ในที่มีกลูโคส กลีเซลรอลหรือกลีเซอรอลดีไฮด์ เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อ *Lb. reuteri* จะสามารถผลิต 3-hydroxypropanal และรูเทอรินได้จากกลีเซอรอล โดยใช้เอนไซม์ NADH + H^+- dehydrogenase ในช่วงระยะ log phase เชื้อจะไม่มีการผลิตรูเทอริน เนื่องจากมี การใช้พลังงานจากการเผาผลาญกลูโคส อย่างไรก็ตาม เมื่อเซลล์เข้าสู่ stationary phase จึงจะเริ่มมีการสะสมรูเทอริน *Lb. reuteri* สามารถสร้างรูเทอรินได้ 3 รูปแบบ โดยส่วนใหญ่จะพบในรูปของ monomer หรือ hydrated monomer

แต่จะพบในรูปของ cyclic dimer เป็นส่วนน้อย อย่างไร ก็ตาม แบคทีเรียอื่นๆ ไม่สามารถย่อยสลายกลีเซลรอลได้ ดังนั้น การสะสมและการปล่อยรูเทอรินจึงจำเพาะกับ *Lb. reuteri* เท่านั้น รูเทอรินมีฤทธิ์ในการยับยั้งที่กว้าง สามารถยับยั้งการเจริญ ของเชื้อแบคทีเรีย รา โปรโตซัว ไวรัส รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติก อย่างไรก็ตาม *Lb. reuteri* จะทนต่อรูเทอรินมากกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกอื่นๆ กลไกการทำงานของรูเทอริน พบว่ารูเทอรินจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ribonucleotide reductase ทำให้รบกวนการสังเคราะห์ DNA แต่พบว่าไม่มีรูเทอรินผลกระทบเชิงลบ ในเซลล์มนุษย์ (Ouwehand; & Vesterlund. 2004: 377-378)

2.4.1.6 แบคทีริโอซิน (Bacteriocins)

แบคทีริโอซินหมายถึงเปปไทด์หรือโปรตีนที่สังเคราะห์จากไรโบโซม และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย แบคทีริโอซินแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (antibiotics) คือแบคทีริโอซิน มีฤทธิ์การยับยั้งแคบและเป็นพิษกับแบคทีเรียที่ มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน แบคทีริโอซินสามารถสร้างได้จากแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบและแกรมบวกหลายสปีชีส์ แต่แบคทีริโอซินที่สร้างจากกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกกลับเป็นที่ได้รับความสนใจมากที่สุด โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกได้หลายช นิด รวมถึงกลุ่มก่อโรคด้วย ซึ่งมีกลไกในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน โดยทั่วไปมักออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายกับเชื้อประจำถิ่นอื่น ซึ่งแบคทีริโอซินจะเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยอาศัยแรง electrostatic และแบคทีริโอซินส่วนใหญ่จ ะเหนี่ยวนำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย แบคทีริโอซินที่มีการศึกษา มากที่สุด คือ ไนซิน โดยกลไกการออกฤทธิ์จะทำให้เกิดรู และขัดขวางกระบวนการ proton motive force รวมทั้งรบกวนสมดุลของ pH เป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออน และการสลายตัวของ ATP ทำให้เซลล์เกิดการตายที่สุด และยังรบกวนการสร้างผนังเซลล์ด้วย ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ได้ที่ความเข้มข้นในระดับนาโนโมลาร์ (nM) (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550: 145-160)

2.4.2 การยึดเกาะของแบคทีเรียกรดแลคติกกับเยื่อบุทางเดินอาหาร

การยึดเกาะของแบคทีเรียกรดแลคติก บริเวณ เซลล์เยื่อบุในระบบทางเดินอาหาร นับเป็นกลไกที่ช่วยขัดขวางการเกาะติดของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *E. coli* และ *Salmonella* กลไกการยึดเกาะจะเริ่มตั้งแต่แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญติดกับผนังลำไส้แล้วเพิ่มจำนวน (Barrow; et al. 1980: 147-154); (Fuller. 1977: 85-94) จากนั้นแบคทีเรียกรดแลคติกจะยึดครองบริเวณ รีเซพเตอร์ที่ผิวเซลล์ทำให้แบคทีเรียก่อโรค ไม่สามารถยึดเกาะในระบบทางเดินอาหารและจะ ถูกกำจัดออกไป ในที่สุด ในการยึดเกาะแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค เช่น *E. coli* จะยึดเกาะที่เซลล์เป้าหมายด้วย พิไล (pili)

ส่วน lactobacilli จะยึดเกาะที่ผนังลำไส้ด้วย extracellular substance เช่น พอลิแซคคาไรด์ โปรตีน ไขมัน และกรดลิโพเทโคอิก (lipoteichoic acid) จากการศึกษาในลำไส้หมู พบว่า lactobacilli จำนวนมากจะสร้างแคปซูล (capsule) ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ โดยพบว่าแคปซูลจัดเป็นส่วนที่ มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนของ lactobacilli ในลำไส้หมู (Wadstrom; et al. 1987: 513-520) ใน *Lb. fermentum* พบว่าส่วนโปรตีนที่อยู่บนผิว เซลล์จะ เป็นปัจจัยหลักในการ ยึดเกาะจับยึดกับเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารหมู (Conway; & Kjelleberg. 1989: 1175-1186)

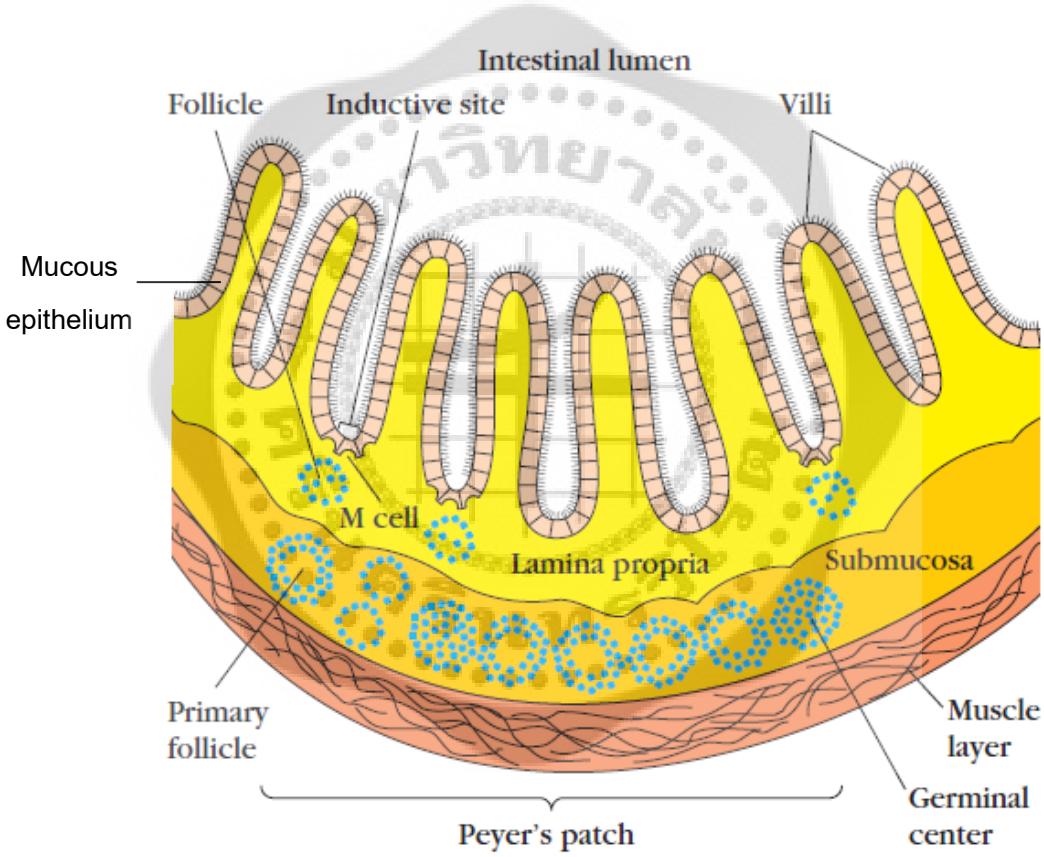
แบคทีเรียกรดแลคติกในแต่ละส ายพันธุ์จะอาศัยความจำเพาะของผิวเซลล์แบคทีเรียกับเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร (Henriksson; et al. 1991: 101-106) เช่น ใน *Lb. acidophilus* และ *Lb. animalis* จะอาศัย lectin-like substance บนผิวเซลล์ในการยึดเกาะกับระบบทางเดินอาหาร (Mukai; Arihara; & Itoh. 1992: 71-77); (Gusils; González; & Oliver. 1999: 981-987) ส่วน *Lb. plantarum* จะอาศัยน้ำตาลแมนโนส ในการยึดเกาะกับ เยื่อบุลำไส้ (Adlerberth; et al. 1996: 2244-2251) นอกจากนี้ *Lactobacillus* ที่แยกจากส่วนของลำไส้ ที่ต่างกัน ได้แก่ ileum, jejunum และ caecum จะมีความสามารถในการยึดเกาะที่เยื่อบุผิวเซลล์ แตกต่างกันไปด้วย (Jin; et al. 1996: 67-71) ส่วนเซลล์ของยูคาริโอตที่มีความจำเพาะต่อการเกาะติดของ *Lb. fermentum* ได้แก่ ไฟโบรเนคติน (fibronectin) (Kapczynski; Meinersmann; & Lee. 2000: 136-141) ในขณะที่ปัจจัยอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ และค่า pH จะไม่มีผลต่อการยึดเกาะของแบคทีเรีย (Jin; et al. 1996: 67-71)

นอกจากนี้สารต่างๆ ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกยังมีผลในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคด้วย เช่น จากการศึกษาโดยใช้ ส่วน supernatant ของ *Lb. acidophilus* LB พบว่า สามารถยับยั้งการยึดเกาะของ *E. coli* ในเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ได้ (Chauviere; et al. 1992: 1689-1699) และยังมีการศึกษาที่พบว่า สารประกอบโปรตีน ที่สร้างจาก *Lb. plantarum* 104R ซึ่งแยกจากกระเพาะหมู สามารถยับยั้งการยึดเกาะของ *E. coli* K88 บนเยื่อเมือกลำไส้เล็กส่วน ileum ลูกหมูได้คิดเป็นร้อยละ 50 โดย สารประกอบโปรตีน ดังกล่าวจะ จับกับ องค์ประกอบเยื่อเมือก จึงขัดขวางการเข้าจับโดย fimbriae ของ *E. coli* K88 (Blomberg; Henriksson; & Conway. 1993: 34-39)

2.4.3 การกระตุ้นให้สัตว์สร้างภูมิคุ้มกัน

โปรไบโอติกสามารถกระตุ้นให้สัตว์สามารถสร้างภูมิคุ้มกันส่งผลให้ยับยั้งหรือทำลายเชื้อก่อโรคได้ โดยพบว่าการเสริม *Lb. acidophilus* และ *Lb. casei* จะเพิ่มการทำงานของ แมโครฟาจ (macrophage) ในหนู (Perdigon; et al. 1986: 404-410) และเมื่อให้ skim milk ที่ผสมด้วยน้ำหมักของ *Lactobacillus* จะช่วยเพิ่มระดับ IgG ได้เล็กน้อย (Nousiainen; & Setala. 1998: 431-473)

โปรไบโอติกจะยึดเกาะบริเวณตัวรับ TLR-2 (Toll-like receptor 2) ของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ (intestinal epithelial cell; IEC) ชักนำให้เกิดการหลั่ง interleukin 6 (IL-6) หรือโปรไบโอติกอาจมีผลต่อการปรับสมดุลและการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิกันที่อยู่บริเวณลำไส้โดยตรง ซึ่งเซลล์ในระบบภูมิกันดังกล่าว ได้แก่ dendritic cell (DC) ที่อยู่ในชั้น lamina propria (ใต้ชั้น epithelium) และ M cell (MC) ที่แทรกอยู่ทั่วไประหว่างเนื้อเยื่อบุผิว (mucous epithelium) หรือบริเวณ peyer's patches (ภาพประกอบ 1) สมมติฐานที่เกี่ยวข้องกับ บทบาทของโปรไบโอติกที่ส่งผลต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันและหน้าที่ในการปรับสมดุลของระบบคุ้มกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แนวทาง (Carolina; et al. 2010:132-136) ดังนี้

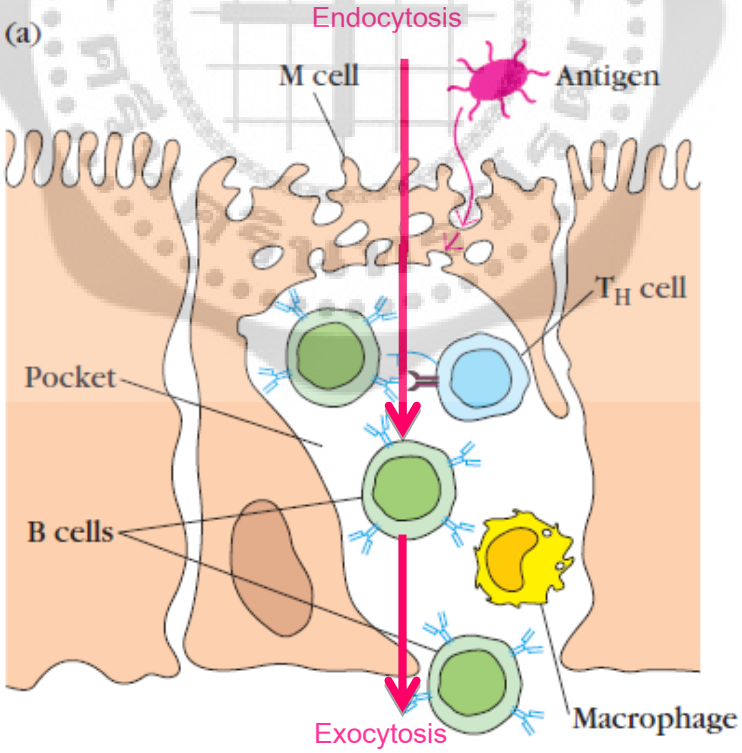


ภาพประกอบ 1 ภาพวาดตามขวางแสดงโครงสร้างและตำแหน่งที่อยู่ของเซลล์และอวัยวะในระบบภูมิคุ้มกันบริเวณลำไส้

ที่มา: Goldsby; Kindt; & Osborne. (2000). *Kuby Immunology*. p 51.

แนวทางที่ 1

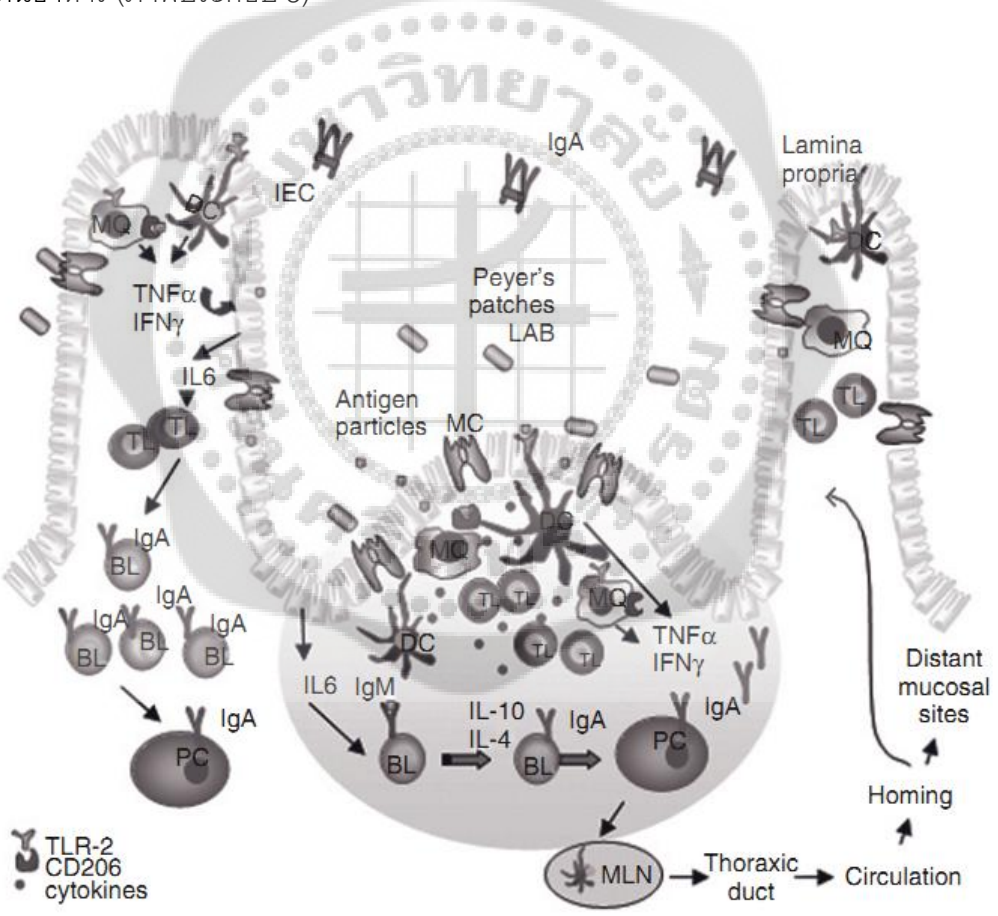
M cell (MC) และ dendritic cell (DC) เป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้ม กันแรกที่ตอบสนองต่ อโปรไบโอติก หรือแอนติเจน อื่นๆ โดยโปรไบโอติก ที่อยู่ในช่องภายในลำไส้ (intestinal lumen) จะถูกนำเข้าสู่เนื้อเยื่อในระบบภูมิคุ้มกันใต้ชั้น epithelium ผ่าน M cell (MC) โดยกระบวนการ endocytosis และส่งออกสู่ชั้นด้านล่างโดยกระบว นการ exocytosis หลังจากนั้นเซลล์ฟาโกไซต์ (phagocytes) ได้แก่ แมโครฟาจ (macrophages: MQ) และ dendritic cell (DC) ที่อยู่ในชั้น epithelium จะเข้ามาจับกิ นโปรไบโอติก หรือแอนติเจน ที่ผ่านเข้ามาโดยกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) และหลั่งไซโตไคน์ (cytokine) ชนิดต่างๆ ได้แก่ TNFα ซึ่งเป็นสารหลักที่มีส่วนในการสื่อสารระหว่างเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันและเซลล์ลำไส้ ภายหลังจากกระบวนการ ฟาโกไซโทซิสสิ้นสุด T lymphocyte (TL) ชนิดที่ทำหน้าที่เป็น T-helper (T_H) จะถูกกระตุ้นโดยการจับกับแอนติเจน (ในที่นี้หมายถึงชิ้นส่วนของโปรไบโอติกที่ถูกย่อยโดยฟาโกไซต์) ที่รวมอยู่กับโมเลกุล class II MHC บนผิวเซลล์นำเสนอแอนติเจน (MQ และ DC) มีผลให้เกิดการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนโคลนของ TL ที่จำเพาะต่อแอนติเจน นั้น ซึ่ง T_H ที่ถูกกระตุ้นนี้จะทำหน้าที่หลั่ งไซโตไคน์ไปกระตุ้น B lymphocyte (BL) (ภาพประกอบ 2)



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างของ M cell

ที่มา: Goldsby; Kindt; & Osborne. (2000). *Kuby Immunology*. p 51.

DC และ MC ที่สัมผัสกับโปรไบโอติกยังสามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่งไซโตไคน์ชนิดอื่นๆ ได้อีก เช่น IL-10, IL-6 และ IL-12 โดยที่ IL-10 และ IL-6 จะไปส่งเสริมการกระตุ้นสัญญาณต่างๆ ของระบบภูมิคุ้มกันที่อยู่ถัดไปเป็น ลูกโซ่ ส่วน IL-10 และ IL-12 จะเกี่ยวข้องกับการปรับสมดุลของระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ IL-6 และ IL-4 ที่หลั่งออกมานั้นยังสามารถชักนำให้เกิดการกระตุ้นและพัฒนาของ B lymphocyte (BL) เฉพาะโคลนที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นๆ (BL ในที่นี้หมายถึง BL ที่เคยสัมผัสกับโปรไบโอติก) โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงของ antibody ที่อยู่บนผิวเซลล์ของ BL จาก IgM เป็น IgA และ BL ที่ถูกกระตุ้นนี้จะมีการพัฒนาไปเป็นพลาสมาเซลล์ (plasma cell) และเซลล์จดจำ (memory B cell) ในกรณีของ plasma cell จะทำหน้าที่สังเคราะห์และหลั่งแอนติบอดีเพียง 1 คลาส (class) จาก 5 คลาสของแอนติบอดีโดยในที่นี้จะหมายถึง IgA ซึ่งเป็นแอนติบอดีที่คัดหลั่งออกสู่เมือกในทางเดินอาหาร (ภาพประกอบ 3)



ภาพประกอบ 3 โครงสร้างเยื่อบุผิวและเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้เล็ก

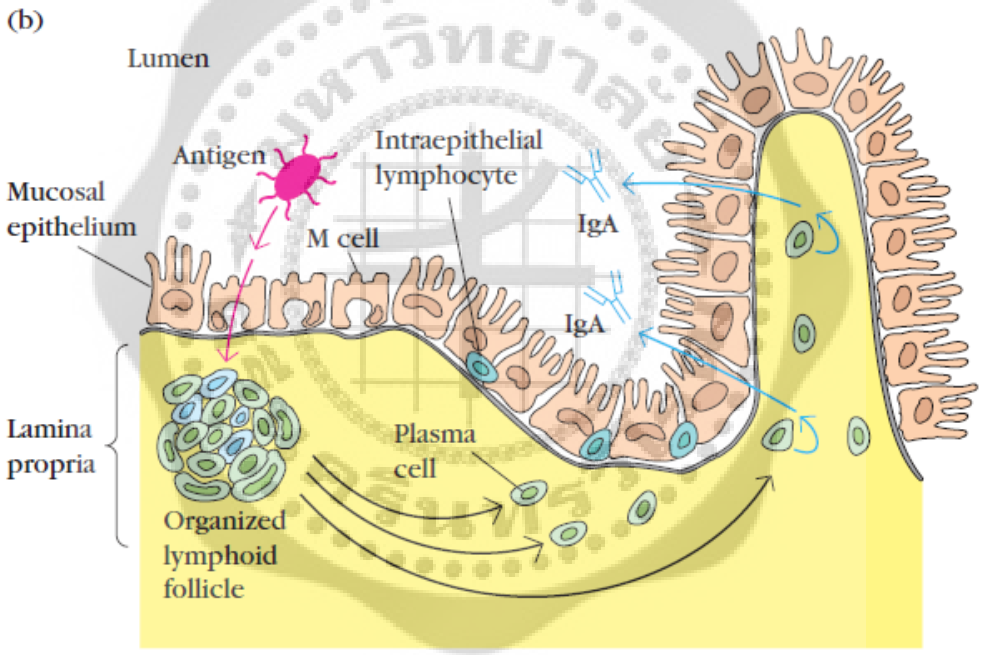
ที่มา: Carolina; et al. (2010). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria : novel applications*. p 133.

แนวทางที่ 2

เกิดโดยโปรไบโอติก สัมผัสกับเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ โดยตรง โดยที่ โปรไบโอติก จะยึดเกาะบริเวณตัวรับ TLR-2 (Toll-like receptor 2) ของเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ (intestinal epithelial cell; IEC) ชักนำให้เกิดการหลั่ง interleukin 6 (IL-6) ซึ่งนำไปสู่การกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ เช่นเดียวกันกับในแนวทางที่ 1 (ภาพประกอบ 3)

แนวทางที่ 3

DC ที่อยู่ในชั้น lamina propria บริเวณลำไส้อาจมีการยื่น dendrite ซึ่งเป็นแขนงของไซโทพลา สซึมแทรกออกไประหว่าง เซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ เพื่อจับกินโปรไบโอติก ที่อยู่ในช่องว่างภายในลำไส้ (lumen) ได้โดยตรง จากนั้นจึงเกิดการกระตุ้นเช่นเดียวกันกับแนวทางที่ 1



ภาพประกอบ 4 การเพิ่มจำนวนของ IgA

ที่มา: Goldsby; Kindt; & Osborne. (2000). *Kuby Immunology*. p 51.

การกระตุ้นที่เกิดจากโปรไบโอติกยังสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของ IgA และ BL ที่อยู่บริเวณชั้นเยื่อเมือก (mucosa) ของลำไส้ และมีการเคลื่อนที่จาก peyer's patches ไปยังต่อมน้ำเหลือง (lymph node) และอวัยวะอื่นๆ เช่น หลอดลมและต่อมน้ำนม (ภาพประกอบ 4)

2.5 การนำโปรไบโอติกมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์

แบคทีเรียกรดแลคติกจัดเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่พบในร ะบบทางเดินอาหารสัตว์ปีก (ตาราง 2) นอกจากนี้ยังอาจพบแบคทีเรียอื่นในระบบทางเดินอาหารของไก่ เช่น *Bacteroides* spp., *Bacteroides fragilis, Bifidobacterium bifidus, Clostridium perfringens, C. beijerinkia, Clostridium* spp., *Eubacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Genniger formicilis, Lb. acidophilus, Lb. fermentum, Lb. salivarius, Micrоccus* spp., *Enterococcus faecium, Ent. faecalis* และ *Ruminococcus obeum* (รุจา มาลัยพวง. 2544)

ตาราง 2 ปริมาณจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของสัตว์ปีก

Organ	Bacteria	Population level (CFU/g)
กระเพาะอาหาร	Lactobacilli	10^9
	Streptococcus sp.	10^4
	E. coli	10^2
ลำไส้เล็ก	Lactobacilli	10^8
	Streptococcus sp.	10^4
	E. coli	10^2
ลำไส้ใหญ่	Lactobacilli	10^9
	Streptococci	10^7
	E. coli	10^6
	Yeast	10^2
	Obligate anaerobe*	10^{10}

หมายเหตุ * ได้แก่ *Eubacterium, Clostridium, Gemmiger, Fusobacterium* และ *Bacteroides* sp.

ที่มา: Tannock. (1992). *Genetic manipulation of gut microoraganisms.* p 185-207.

ปัจจุบันได้มีการนำโปรไบโอติกของ lactobacilli และ bifidobacteria ที่ทราบสปีชีส์นำมาใช้อย่างแพร่หลาย ได้แก่ *Lb. acidophilus, Lb. amylovorus, Lb. brevis, Lb. bulgaricus, Lb. casei, Lb. casei* subsp. *rhamnosus, Lb. crispatus, Lb. delbrueckii, Lb. fermentum,*

Lb. gallinarum, Lb. jensenii, Lb. johnsonii, Lb. plantarum, Lb. reuteri, Lb. rhamnosus, Lb. salivarius, Lb. sporogenes, Lb. vaginalis, B. adolescentis, B. animalis, B. bifidum, B. breve, B. infantis, B. lactis, B. longum และ *B. regularis* (Tannis. 2008: 32) การนำโปรไบโอติกมาใช้จริงนั้นจำเป็นต้องตรวจสอบความปลอดภัยของแต่ละสายพันธุ์ที่นำมาใช้ โดยโปรไบโอติกที่ใช้ไม่ควรส่งผลเสียต่อโฮสต์ เช่น การสร้างแอมโมเนีย หรือการดื้อยาปฏิชีวนะเป็นต้น จากที่ประชุม “The Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed (FEEDAP)” ได้สรุปหลักเกณฑ์ในการที่จะนำแบคทีเรียมาใช้ในมนุษย์และสัตว์ควรต้องมีการศึกษาการดื้อยา โดยดูจากค่า minimal inhibitory concentration (MIC) (EFSA. 2008: 1-15) แบคทีเรียที่มีการดื้อยาในปริมาณสูงจะไม่เหมาะในการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก นอกจากนี้โปรไบโอติกที่เหมาะสมในการนำมาใช้จะต้องไม่สามารถสร้างสารประกอบเอมีนจากโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในอาหาร ซึ่งโดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนองค์ประกอบในอาหารไปเป็นสารประกอบที่เป็นอันตรายต่อโฮสต์ โดยเฉพาะการสร้างเอมีนในระหว่างการย่อยโปรตีนในอาหาร(Watson; & Preedy. 2010)

การนำโปรไบโอติกมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์อาจใช้ในรูปสายพันธุ์เดี่ยวหรือสายพันธุ์ผสม โดยใช้ในรูปผงที่บรรจุในแคปซูล แกรนูล ในรูปเซลล์เปียกหรือเชื้อสด โดยป้อนให้สัตว์ทางปากโดยตรงหรือผสมลงในอาหาร และน้ำดื่ม รวมทั้งสามารถนำมาใช้ในรูปแบบของสเปรย์เพื่อพ่นรอบพื้นที่โรงเรือนเพื่อปรับสภาพแวดล้อมของจุลินทรีย์ในโรงเรือน (Fuller. 1992)

การนำโปรไบโอติกมาใช้ในสัตว์ มีการศึกษาในสัตว์หลายประเภท ได้แก่

1. การนำโปรไบโอติกมาใช้ในไก่

การนำโปรไบโอติกมาใช้จะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของไก่ เช่น *Salmonella, E. coli, S. aureus* เป็นต้น จากการศึกษาการติดเชื้อ *Salmonella* พบว่า เชื้อดังกล่าวมักจะอาศัยอยู่ในลำไส้ไก่ โดยไม่แสดงอาการ ลูกไก่ จะมีความไวที่สุดที่จะได้รับเชื้อ ซึ่งเชื้อจะเจริญได้ดีในทางเดินอาหารของลูกไก่ แล้วเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว พบมากในส่วนของไส้ติ่ง (Brownell; Sadler; & Fanelli. 1969: 804-816) จากการศึกษาโดยการ นำของเหลวจากทางเดินอาหารของไก่ที่โตเต็มวัยและมีสุขภาพสมบูรณ์เจือจางกับน้ำเกลือ แล้วนำมากรอกให้ลูกไก่แรกเกิดทางปาก จากนั้น 24 ชั่วโมง จึงกรอกตามด้วยเชื้อ *Salmonella* Infantis พบว่า การให้ของเหลวจากทางเดินอาหารของไก่ที่โตเต็มที่และมีสุขภาพดีนี้จะช่วยป้องกันการเจริญของเชื้อ *S.* Infantis ในทางเดินอาหารของไก่ได้ (Numi; & Rantala. 1973: 210-211) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ การศึกษาของฟลูเลอร์และบรูคเกอร์ (Fuller; & Brooker 1974: 1305-1312) พบว่า เมื่อใช้ของเหลวที่แยกจากส่วนต่างๆ ของลำไส้ไก่หรือไก่งวงที่เติบโตเต็มที่และมีสุขภาพสมบูรณ์ มาเจือจางในน้ำเกลือ แล้วนำไปกรอกให้ลูกไก่

และลูกไก่งวง หลังจากนั้น 3 วัน จึงกรอกเชื้อ *S.* Typhimurium พบว่า ของเหลวที่แยกจากส่วนต่างๆ ของลำไส้มีผลป้องกันการเจริญของเชื้อ *S.* Tryhimurium (Lioyd; Cumming; & Kent. 1997: 82) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของ *Lb. acidophilus* ในการลดจำนวนเชื้อก่อโรคจะเกิดได้ดีที่กระเพาะพัก แต่ให้ผลไม่ดีนักในลำไส้ใหญ่ และไส้ตรง (Watkins; & Miller. 1983: 1772-1779) ออดิซิโอและคณะ (Audisio. et al. 2000: 1333-1337) ทำการทดลองเพื่อศึกษาผลในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *Salmonella pullorum* หรือที่เรียกว่า โรคขี้ขาว โดย ใช้ *Ent. faecium* J96 ที่แยกได้จากไก่สุขภาพดี และผ่านการทดสอบมาแล้วว่าสามารถผลิตแบคทีริโอซิน และกรดแ ลคติก มายับยั้ง *S. pullorum* จากผลการทดลอง สำหรับการให้เพื่อป้องกัน จะให้ *Ent. faecium* J96 โดยตรงทางปาก ลูกไก่อายุ 30 ชั่วโมง เมื่ออายุครบ 4 วัน จะให้เชื้อ *S. pullorum* M97 โดยตรงในกระ เพาะพักของลูกไก่ ส่วนการทดสอบเพื่อรักษาโรค จะให้ *Salmonella* แก่ลูกไก่ตั้งแต่อายุ 30 ชั่วโมงก่อน แล้วตามด้วยการให้ *Ent. faecium* J96 ผลการวิจัยในการให้ *Ent. faecium* J96 เพื่อป้องกันโรค พบว่า ไก่มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 75 และสภาพของม้ามและตับก็ปกติด้วย ขณะที่ กลุ่มควบคุมซึ่งให้เฉพา ะ *Salmonella* ปรากฏอัตราการตายคิดเป็นร้อยละ 50 สำหรับการใช้ เพื่อการรักษา จะพบว่าไก่ ตาย ทั้งหมด จากรายงานนี้แสดงให้เห็นว่า ลูกไก่แรกเกิดมีความเสี่ยงสูงต่อการติดเชื้อ *Salmonella* และการให้โปรไบโอติกจะมีส่วนช่วยให้อาการดีขึ้นได้ นอกจากนี้ยังมีการทดลองจำนวนม ากที่ให้ผลในทำนองเดียวกันนี้ ที่พบว่าการเสริมโปรไบโอติกจะส่งผล ควบคุมและยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* ในลำไส้ไก่ได้ (Corrier; et al. 1995: 916); (Nisbet; Corrier; & DeLoach. 1995); (Watkins; & Miller. 1983: 1772-1779); (ฐิติพงษ์ ธนะรัชติกานนท์. 2539); (ปัญชลี ประคองศิลป์. 2541); (Yeo; & Kim. 1997: 381-385); (Pascual; et al. 1999: 4981-4986); (ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ ฐิติพงศ์ ธนะรัชติกานนท์. 2540: 10-13)

การศึกษาผลในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* โดยใช้เชื้อ *Lb. acidophilus* เพื่อป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจาก *E. coli* ในลูกไก่ สำหรับการทดลองเพื่อป้องกันโรคทำการ ศึกษาโดยทำการกรอกเชื้อ *Lb. acidophilus* ให้กับลูกไก่อายุประมาณ 2 วันก่อน หลังจากนั้นอีก 2 วัน จะให้เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ที่ก่อโรคในไก่ ผล การทดลองพบว่า *Lb. acidophilus* ที่ให้ไก่ในช่วงแรกช่วยลดอัตราการตายของลูกไก่ได้ ส่วนในการทดลองเพื่อรักษาโรคที่เกิดจาก *E. coli* ทำโดยการกรอกเชื้อ *E. coli* ก่อนประมาณ 10^8-10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้กับลูกไก่อายุ ประมาณ 2 วัน หลังจากนั้นอีก 2 วัน จึงกรอกเชื้อ *Lb. acidophilus* ประมาณ 10^8-10^9 เซลล์ต่อมิล ลิลิตร ผลการทดลองพบว่า การให้เชื้อ *Lb. acidophilus* มีผลช่วยลดอัตราการตายของลูกไก่ได้ โดยการให้ *Lb. acidophilus* ไม่ว่าจะให้ก่อนหรือหลังจากได้รับ *E. coli* มีผลทำให้ pH ในกระเพาะพัก ลำไส้ใหญ่ และไส้ตรงลดลง (Watkins;

Miller; & Nell. 1982: 1298-1308) นอกจากนี้ จากการศึกษาของ จินและคนอื่นๆ (Jin; et al. 1998: 197-209) ยังพบว่า เมื่อทดลอง ให้อาหารที่ผสมด้วย *Lactobacillus* แก่ไก่กระทง จะสามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม โคลิฟอร์มในกระพุ้งลำไส้ส่วนต้นได้ และพบ lactobacilli สูงกว่ากลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับ เอ็นโดและคนอื่นๆ (Endo; et al. 1999: 1569-1575) ซึ่งมีการใช้เชื้อผสมของ โปรไบโอติกกับเชื้อก่อโรค (*Bacillus, Lactobacillus, Streptococcus, Clostridium, Saccharomyces* และ *Candida)* ให้แก่ไก่ตัวผู้ พบว่า สามารถช่วยลดจำนวนของ Enterobacteriaceae ในกระพุ้งลำไส้ใหญ่ได้อย่างมา ก โดย *Bacillus, Streptococcus, Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* จะมีจำนวนเพิ่มขึ้น ในขณะที่ยีสต์จะมีจำนวนลดลง ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าโปรไบโอติกช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของไก่

นอกจากประโยชน์ในการยับยั้ งหรือทำลายเชื้อก่อโรคแล้ว การเสริมโปร ไบโอติกจะทำให้ไก่มีสุขภาพแข็งแรงและมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น โดยพบว่าเมื่อ เสริม *Lb. acidophilus* จะช่วยให้ไก่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น (Murry; Hinton; & Morrison. 2004: 603-607); (Jin; et al. 1998: 197-209); (Tahia; Porubean; & Gukstrom. 1983: 32) เช่นเดียวกับการเสริ มโปรไบโอติกจากเชื้อชนิดอื่น อาทิ โปรไบโอติกที่ใช้ทางการค้า (Primalac) (Angel; et al. 1999: 58, 98) *Lb. reuteri* (เพิ่มศักดิ์ ศิริวรรณ; บัวเรียม มณีวรรณ ; และ เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์ . 2551: 64-70) *Lb. acidophilus* และ *Enterococcus* (ชื่อทาง การค้า คือ Lacto-sacc) (Atherton; & Robins. 1987: 167-196) *Lactobacillus* spp. (ฐิติพงษ์ ธนะรัชติกานนท์ . 2539) *Saccharomyces cerevisiae* ร่วมกับ *Ent. faecium* C-28 ซึ่งในการใช้พบว่า โปรไบโอติกผสมของเชื้อ *S. cerevisiae* ร่วมกับ *Ent. faecium* C-28 จะช่วยให้เชื้อสร้างกรด แลคติก มากขึ้น และ เพิ่ม กิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซิเม ธิลเซลลูเลส (carboxylmethyl cellulase) ในการย่อยเซลลูโลสใน อาหารที่ค้างในไส้ติ่งได้อย่างมาก (Kumprecht; & Zobac. 1998: 63-70) นอกจากนี้ยัง พบว่าไก่จะมี ประสิทธิภาพ ในการใช้อาหารดีขึ้น (Atherton; & Robins. 1987: 167-196)

การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างการเสริ มโปรไบโอติกกับสารปฏิชีวนะ พบว่า เมื่อเสริมโปรไบโอติกและสารปฏิชีวนะต่างชนิดกัน ในไก่งวง จะให้ค่าน้ำหนักเฉลี่ยที่แตกต่างกัน แต่ส่วนใหญ่ไก่กลุ่มได้รับโปรไบโอติกและสารปฏิชีวนะเ สริมร่วมกันจะมีประสิทธิภาพการ กินอาหารดีกว่ากลุ่มได้รับสารปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว และจำนวน *Salmonella* ในกระเพาะพักและลำไส้ใหญ่ จะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่ไม่ได้รับโปรไบโอติก (Javed; Siddique; & Hameed. 1994: 254-257) สำหรับในไก่กระทงที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติกมีน้ำหนักเฉลี่ ยต่อวันสูงกว่ากลุ่มควบคุม

ในช่วง 3 สัปดาห์แรก โดยลดแอคติวิตีของเอนไซม์ยูรีเอสในลำไส้เล็ก ของไก่ได้ ทำให้ลดการสะสมของปริมาณแอมโมเนีย ที่เป็นพิษต่อลำไส้ลง ส่งผลให้ไก่มีสุขภาพแข็งแรง และเจริญเติบโตดีกว่าไก่กลุ่ม ที่ได้รับสารปฏิชีวนะ chloroxytetracyline (Yeo; & Kim. 1997: 381-385) ฟรานซิส และคนอื่นๆ (Francis; et al. 1978: 1687-1689) ได้ศึกษาการใช้ *Lactobacillus* ร่วมกับ zinc bacitracin พบว่าการเสริมเชื้อ *Lactobacillus* มีผลทำให้การเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการเปลี่ยนสารอาหาร ของลูกไก่งวงเมื่ออายุ 3 สัปดาห์ดีกว่ากลุ่มซึ่งไม่มีการให้เชื้อและ กลุ่มที่ให้ zinc bacitracin การเสริมเฉพาะ *Lactobacillus* หรือ zinc bacitracin เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง มีผลทำให้ลูกไก่งวงที่ทดลองมีน้ำหนักตัวสูงกว่า และประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารดีกว่าไก่งวงที่ได้รับอาหารซึ่งเสริมทั้งเชื้อ *Lb. acidophilus* และ zinc bacitracin ร่วมกัน และยังตรวจพบว่าลูกไก่งวงที่ได้รับอาหารที่เสริมเชื้อ *Lb. acidophilus* มีจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์ม ในระบบทางเดินอาหารน้อยกว่า กลุ่มที่เสริม zinc bacitracin และการเสริม *Lb. acidophilus* มีผลทำให้จำนวนของ *Lactobacillus* ที่ตรวจพบในทางเดินอาหารของลูกไก่งวงสูงขึ้น แต่การเสริม zinc bacitracin ร่วมกับ *Lb. acidophilus* มีผลทำให้จำนวน *Lactobacillus* ที่ตรวจนับจากทางเดินอาหารของลูกไก่งวงลดลง สำหรับการศึกษาผลของโปรไบโอติกต่อน้ำหนักตัวของไก่กระทงและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยเสริมโปรไบโอติกลงในน้ำให้ไก่กิน พบว่าการเสริมโปรไบโอติกช่วยเพิ่มน้ำหนักตัวและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันได้อย่างมีนัยสำคัญ (Kabir; et al. 2004: 361-364)

โปรไบโอติกยังมีผลของต่อการลดปริมาณของคลอเรสเตอรอลในไข่ไก่ โดยเมื่อใช้ *Lb. acidophilus* เสริมในอาหารไก่ไข่จะลดปริมาณคลอเลสเตอรอลในไข่แดงลงถึง ร้อยละ 18.8 และยังพบว่า โปรไบโอติกมีส่วนช่วยให้เมแทบอลิซึมของไขมันดีขึ้นด้วย (Endo; et al. 1999: 1569-1575); (Haddain; et al. 1996: 494-497) รวมทั้งเพิ่มระดับเอนไซม์อะไมเลส ในลำไส้เล็กได้ แต่ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรทิโอไลติก และไลโปไลติก นอกจากนี้ยังสามารถลดกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคโรนิเดสในทางเดินอาหารของไก่ และในมูลไก่ ซึ่งเอนไซม์เบต้ากลูโคโรนิเดส จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างสารพิษและสารก่อมะเร็งต่างๆ (Jin; et al. 2000: 886-891) และยังพบว่าอาหารที่เสริมโปรไบโอติกจะทำให้ไก่มีการผลิตไข่มากขึ้น (Haddadin; et al. 1996: 494-497); (Charles; & Duke. 1978: 1125); (Cerniglia; Goodling; & Herbert. 1983: 1399); (Ryu; Song; & Kim. 1999: 99); (Xu; et al. 2006: 364-368)

2. การนำโปรไบโอติกมาใช้ในสุกร

จำรูญ มณีวรรณ; มงคล ถิรบุญยานนท์; และกิตติพงษ์ ทิพยะ (2553) ได้ศึกษาการใช้ *B. subtilis* ป้อนให้กับแม่สุกรอุ้มท้องและแม่สุกรเลี้ยงลูก และตรวจดูผลในลูกสุกร จากผลการทดลองพบว่า น้ำหนักของลูกสุกร และอัตราการเจริญ ของกลุ่มที่ได้รับการเสริม *B. subtilis* MP 9 และ MP 1 สูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับการเสริมยาปฏิชีวนะ ทางด้านจำนวนวันที่ลูกสุกรแสดงอาการท้องเสียจนหายเป็นปกติของกลุ่มที่ได้รับการเสริ ม *B. subtilis* MP 9, MP 10 และกลุ่มที่ได้รับการเสริมยาปฏิชีวนะมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม สำหรับจำนวนเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* ในมูลสุกรทั้ง 2 กลุ่มมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

3. การนำโปรไบโอติกมาใช้ในกุ้งกุลาดำ

ไตรมาศ บุญไทย; วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย; และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ (2550: 483-490) ได้ทดลองใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกผสม 2 รูปแบบ คือ โปรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิ ตที่มีความเข้มข้น 10^7 CFU/ml และเซลล์แช่แข็งเติมลงในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำ จากนั้นนำมาเลี้ยงกุ้งกุลาดำอายุ 1 เดือน เป็นเวลา 120 วัน โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมโปรไบโอติก จากการทดลองพบว่า กุ้งกุลาดำกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติก ในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งมีปริมาณ *Vibrio* ในตับลดลงร้อยละ 46.13 และ 34.86 ตามลำดับ และในลำไส้ลดลงร้อยละ 62.21 และ 34.89 ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามปริมาณ *Vibrio* ในตับและลำไส้กุ้งกุลาดำของกลุ่มควบคุมมีปริมาณเพิ่มขึ้น ดังนั้นแบคทีเรียโปรไบโอติกที่เติมในอาหารเลี้ยงกุ้งกุลาดำจึงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ *Vibrio* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคของกุ้งกุลาดำ สำหรับปริมาณแบคทีเรียโปรไบโอติกในตับของกุ้งกุลาดำกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์แช่แข็งเพิ่มขึ้นร้อยละ 103.33 และ 103.69 ตามลำดับ และปริมาณโปรไบ โอติกในลำไส้กุ้งกุลาดำเพิ่มขึ้นร้อยละ 95.47 และ 115.65 ตามลำดับ แสดงว่าแบคทีเรียโปรไบโอติกสามารถเพิ่มจำนวนและมีชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำได้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้การทดลอง	บริษัท	ประเทศ
ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator)	SHEL-LAB	Germany
หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)	Meditop Co., Ltd	Thailand
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)	Science Tech	Thailand
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot–air sterilizing oven)	Fisher Scientific	UK
เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)	Du Pont	USA
กล้องจุลทรรศน์ (microscope)	Olympus	Japan
เครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis apparatus)	Bioer Technology	China
เครื่อง Thermal Cycler	Eppendorf	USA
ชุดถ่ายภาพเจล	Viber Lourmat	Germany
เครื่องวัด pH (pH meter)	Fisher Scientific	UK

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี และเซลล์เพาะเลี้ยง

ตาราง 4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
MRS agar	Hi-media	India
MRS broth	Hi-media	India
Nutrient agar	Hi-media	India

ตาราง 4 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Sodium chloride	Labscan	USA
Ethidium bromide	Bio-Rad	USA
Loading dye	Fermentas	Thailand
TAE buffer	MERCK	Germany
เซลล์เพาะเลี้ยง COLO 205	Gibco	USA
RPMI Media	Gibco	USA
Petri dish	Nunclon	USA
Calcium carbonate	Sigma	USA
Hydrogen peroxide	Sigma	USA
Oxgall	Sigma	USA
Hexadecane	Sigma	USA
อาหารไก่เนื้อ	RT agritech	Thailand

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและการเก็บรักษาเชื้อ

ทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระจากสัตว์ ได้แก่ วัว หมู ไก่ และเป็ด ในฟาร์ม ต่างๆ ทั้งหมด 150 ตัวอย่าง จากจังหวัดลพบุรี พิษณุโลก และนครปฐม เพื่อนำมาใช้การแยกแบคทีเรียกรดแลคติก โดยนำตัวอย่างอุจจาระทั้งหมดมาเจือจางในโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ร้อยละ 0.85 จากนั้นนำค่าตัวอย่างที่มีความเจือจางที่เหมาะสม มา 0.1 มิลลิลิตร มาทำการ spread บนอาหาร de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) agar (ภาคผนวก ก ห มายเลข 1) ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ร้อยละ 0.5 และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ใน candle jar คัดเลือกโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) มาทำการ streak อีกครั้งในอาหาร MRS agar จนได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในสารละลายกลีเซอรอล 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) ในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีการใช้งาน

2. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

2.1 การคัดเลือกเบื้องต้น

2.1.1 รูปร่าง

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีบริเวณใสรอบ โคโลนีบน อาหาร MRS agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ร้อยละ 0.5 นำไปย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่าง เก็บเชื้อที่ติดสีแกรมบวกรูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์ เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2.1.2 การทดสอบเอนไซม์คะตะเลส

ใช้ loop เขี่ยเชื้อจากข้อ 2.1.1 ที่เจริญบนอาหาร MRS agar มาแตะลงบนสไลด์ที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ร้อยละ 3 จำนวน 1 หยด โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจะให้ผลลบ

นำเชื้อทดสอบที่มีลักษณะดังข้อ 2.1.1 และให้ผลลบในข้อ 2.1.2 ซึ่งคาดว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกให้เก็บไว้เพื่อนำไปทดสอบขั้นต่อไป (Axelsson. 1998: 1-72)

2.2. การจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA

2.2.1 การทำ colony PCR

นำแบคทีเรียกรดแลคติกจากการทดล องข้างต้นมาทำการจัดจำแนกชนิดด้ว ยเทคนิค colony PCR โดยใช้ primer จำเพาะบริเวณ 16S rDNA (Erko; & Michael. 1991) ดังนี้

forward primer (8-27f): 5′ AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG 3′

reverse primer (1492r): 5′ TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT 3′

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS agar โดยวิธี cross streak plate ให้ได้เชื้อโคโลนีเดี่ยว บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ปลายไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 1 โคโลนี นำมาใส่ PCR mixture ที่ประกอบด้วย BlueMix DNA polymerase mastermix 25 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) forward primer 3.33 ไมโครลิตร reverse primer 3.33 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของ แต่ละ primer เท่ากับ 0.67 โมลาร์) sterile ddH_2O 22.24 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมด 50 ไมโครลิตร นำไปเข้าเครื่อง Authorized Thermal Cycler โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มจำนวนชิ้ นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ตามขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 preheating	อุณหภูมิ 94	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 5 นาที
ขั้นตอนที่ 2 denaturing	อุณหภูมิ 94	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
ขั้นตอนที่ 3 annealing	อุณหภูมิ 47	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 1 นาที
ขั้นตอนที่ 4 extension	อุณหภูมิ 72	องศาเซลเซียส	เป็นเวลา 2 นาที

ขั้นตอนที่ 5 ทำซ้ำขั้นที่ 2-4 เป็นจำนวน 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 6 final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
ขั้นตอนที่ 7 คงอุณหภูมิไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการวิเคราะห์ต่อไป

2.2.2 วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (gel electrophoresis)

นำชิ้นดีเอ็นเอ ที่ได้จากข้ อ 2.2.1 ไปวิ เคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิสโดย ใช้อะกะโรสเจล ร้อยละ 1 ชั่งอะกาโรส 1 กรัม ผสมกับ 0.5X TAE buffer 100 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) นำมาหลอมให้ละลายแล้วเทลงใน gel apparatus เมื่อเจลแข็งตัวจึงนำมาใส่ chamber จากนั้นเท 0.5X TAE buffer ให้ท่วมเจล นำดีเอ็นเอของแบคทีเรีย จากการทำ PCR มาผสมกับ loading dye แล้ว load ลงในช่องภายในเจล ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที นำเจลมาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide (0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างน้ำเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจดูเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ดีเอ็นเอจะปรากฏให้เห็นเป็นแถบสีส้มการตรวจสอบด้วยวิธีนี้จะเปรียบเทียบกับดีเอนเอมาตรฐาน (2-Log DNA Ladder, New England Biolabs) โดยชิ้นดีเอ็นเอจะมีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส

2.2.3 การเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA กับลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล

นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ส่งไปหา ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA (1st Base, Malaysia) จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องโดยใช้โปรแกรม Chromas version 2.0.1 (Technelysium Pty Limited, Australia) และวิเคราะห์ลำดับเบสด้วย โปรแกรม Bioedit version 7.0.9 (Tom Hall, North Carolina State University) จากนั้นนำลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอไปเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับเบสบ ริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information: GenBank โดยใช้โปรแกรม blastn (Basic Local Alignment Search Tool) (http://www.ncbiv.nlm.nih.gov/BLAST)

3. การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อที่แยกได้

3.1 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้มา ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้วิธี agar spot test (Schillinger; & Lücke. 1989: 1901-1906) ดังนี้

3.1.1 ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก ที่แยกได้ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในหลอดเกลียวปิดสนิท จนกระทั่งเชื้อเจริญ

จากนั้นนำมาหยดลงบนอาหาร MRS agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ใน candle jar จนกระทั่งโคโลนีเจริญ

3.1.2 นำเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งเอียง NA (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) ทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli, Staphylococous aureus, Shigella* sp., *Salmonella* sp. และ *Klebsiella* sp. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาทำเป็นเซลล์แขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 5 สายพันธุ์ให้มีความเข้มข้น 10^7 CFU/ml

3.1.3 ใช้เชื้อทดสอบจากข้อ 3.1.2 มาใส่ลงใน MRS soft agar ที่มี agar ร้อยละ 0.5 จากนั้นเททับลงบน MRS agar ที่หยดเชื้อไว้ แล้วในข้อ 3.1.1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน candle jar คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลกติก ที่แสดงบริเวณยับยั้งมากที่สุด เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3.2 **การศึกษาความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดี** (Guo; et al. 2010: 321-326)

3.2.1 การตรวจสอบกา รเจริญในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีสูง โดยทำการเลี้ยง เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3,000xg เป็นเวลา 15 นาที นำไปล้าง 2 ครั้งใน phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) นำมาตรวจสอบการเจริญในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีสูง โดยเตรียมอาหารเหลว MRS ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นทำ การเติม oxgall ร้อยละ 0.3 และร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) แล้วผ่าน การทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ที่เตรียมไว้ลงไป 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ใน candle jar ตรวจสอบการเจริญโดย วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร (OD_{640}) โดยใช้อาหารเหลว MRS เป็น blank

3.2.2 การตรวจสอบการเจริญในสภาวะ pH ต่ำ โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3,000xg เป็นเวลา 15 นาที นำไปล้าง 2 ครั้งใน phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) นำมาตรวจสอบการเจริญในสภาวะ pH ต่ำ โดยเตรียมอาหารเหลว MRS ที่ปรับค่า pH 4.0 และ 3.5 (โดยใช้ 1M HCl) (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่เตรียมไว้ ลงไป 100 ไมโครลิตร แล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ใน candle jar ตรวจสอบการเจริญโดย วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร (OD_{640}) โดยใช้อาหารเหลว MRS เป็น blank

3.3 การศึกษาความมีขั้ว – ไม่มีขั้ว เพื่อดูคุณสมบัติการเกาะติดลำไส้

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้มา ศึกษาความมีขั้ว - ไม่มีขั้ว เพื่อดูคุณสมบัติการเกาะติดลำไส้ ซึ่งการเกาะติดของแบคทีเรียกรดแลคติกอาจเกิดจาก อันตรกิริยาจำเพาะและไม่จำเพาะ (specific and nonspecific interactions) เช่น ความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ซึ่งการเกาะติดโดยอาศัยคุณสมบัติความ ไม่ชอบน้ำจะทดสอบได้ โดยใช้ไฮโดร คาร์บอนที่ไม่มีขั้ว ได้แก่ hexadecane โดยวิธีทดลองทำได้โดย นำเซลล์แขวนลอย ของแบคทีเรียกรดแล คติกที่มีการปรับความเข้มข้นประมาณ 10^8 CFU/ml วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 640 นาโนเมตร (OD_{640}) ซึ่งกำหนดค่าให้เป็น (A1) ใส่ในหลอดทดลอง 3.5 มิลลิลิตร แล้วเติม hexadecane 0.5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 2 นาที และตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาทีให้ เกิดการแยกชั้น นำส่วนที่อยู่ในชั้นด้านล่าง (aqueous phase) มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร ซึ่งกำหนดค่าให้เป็น (A2) คำนวณ Percent Hydrophobicity Index (HPBI) จากสมการดังนี้

$$\%HPBI = [(A1-A2) / A1] \times 100$$

โดยไอโซเลต ที่มี HPBI มากกว่าร้อยละ 70 ถูกจัดเป็นประเภทไม่ชอบน้ำมาก (high hydrophobicity)

ไอโซเลต ที่มี HPBI ระหว่างร้อยละ 50 และร้อยละ 70 ถูกจัดเป็นประเภทไม่ชอบน้ำปานกลาง (moderate hydrophobicity)

ไอโซเลต ที่มี HPBI ต่ำกว่าร้อยละ 50 ถูกจัดเป็นประเภทไม่ชอบน้ำต่ำ (low hydrophobicity) (Rosenberg; Gutnick; & Rosenberg. 1980: 29-33)

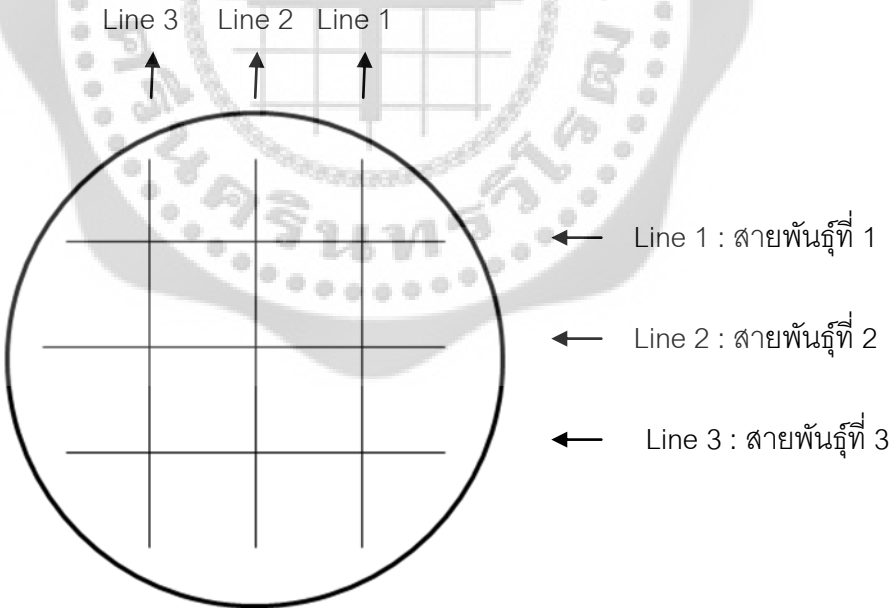
3.4 การศึกษาความสามารถในการเกาะติดลำไส้โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

การศึกษาความสามารถในการเกาะติดลำไส้ ของเชื้อแบคทีเรีย กรด แลคติกที่ถูกคัดเลือกโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง โดยทำการ เลี้ยงเซลล์ COLO 205 (Chung-Yi Wang. et al. 2010: 578-585) ซึ่งเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่มาจากเยื่อบุผิวลำไส้ใหญ่ส่วนที่ เป็นมะเร็งบริเวณ colon (epithelial: colorectal adenocarcinoma) ใน RPMI medium 1640 ที่เติม 10% fetal bovine serum เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากเซลล์เจริญให้ดูด RPMI medium ออก 1 มิลลิลิตร แล้ว ใส่เซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่แขวนลอยใน RPMI medium โดยปรับให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 10^8 CFU/ml ลงไป 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มที่มี คาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมา ล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 (ภาคผนวก ข หมายเลข 3)

3 ครั้ง ทำการตรึงเซลล์ด้วย เมทานอล ความเข้มข้น ร้อยละ 70 (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้แห้ง ทำการ ย้อมสีแกรมแล้วนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดอินเวอร์เต็ด (inverted microscope) นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก ที่เกาะติดเซลล์เพาะเลี้ยงโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบ คุมซึ่งไม่ใส่แบคทีเรียกรดแลคติก และกลุ่ม negative control ที่ใส่เชื้อ *Bacillus megaterium* โดยสุ่มนับตัวอย่างละ 10 บริเวณ

4. การทดสอบการอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก (Coexistence test) เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกสายพันธุ์ผสม

การทดสอบ การอยู่ร่วมกัน ของเชื้อแบคทีเรีย กรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก โดย นำแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 1, 2 และ 3 มาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ในแนวตั้งแล้วขีดอีกครั้ง ในแนวที่ตั้งฉากกัน (Daeschel. 1992: 57-80) ดังภาพประกอบ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีออกซิเจน สังเกตการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในบริเวณที่เป็นจุดตัดกัน คัดเลือกสายพันธุ์ที่ไม่มีบริเวณที่ยับยั้งเกิดขึ้นบริเวณจุดตัดซึ่งแสดงถึงการอยู่ร่วมกันโดยไ ม่มีการยับยั้งซึ่งกันและกันเพื่อนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกสายพันธุ์ผสม



ภาพประกอบ 5 การทดสอบการอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก

5. การผลิตอาหารไก่เสริมโปรไบโอติกในรูปเชื้อสด

5.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน candle jar จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 4,000xg เป็นเวลา 15 นาที นำไปล้าง 2 ครั้งใน phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) และปรับให้มีปริมาณเซลล์เป็น 9.0 x 10^8 CFU/ml

5.2 การผสมเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารไก่เนื้อ

ผสมแบคทีเ รียกรดแ ลคติกที่เตรียมได้จากข้อ 5.1 กับอาหารไก่ เนื้อ (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ในอัตราส่วน 1: 2 ทำให้แห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เก็บรักษาอาหารไก่เนื้อไว้ในตู้เย็นเพื่อรักษาความมีชีวิตของเชื้อสด (รุจา มาลัยพวง. 2544: 98)

5.3 การตรวจนับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารไก่เนื้อ

นำอาหารไก่ เนื้อที่เตรียมได้จากข้อ 5.2 ปริมาตร 1 กรัม มาแขวนลอยใน PBS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางระดับละ 10 เท่า นำหลอดที่มีค่าการเจือจางที่เหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร มา spread ลงบนอาหาร MRS agar ที่เติมแคลเซียม คาร์บอเนตร้อยละ 0.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน candle jar ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยบันทึกเป็นจำนวนเซลล์ต่อกรัมอาหาร

6. การทดสอบภาคสนามเพื่อตรวจสอบผลของโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ

6.1 การศึกษาผลของโปรไบโอติกในอาหารไก่เนื้อ

ทำการทดลอง โดยใช้ไก่เนื้อพันธุ์ Ross308 อายุ 7 วัน วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 8 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีไก่ 6 ตัว รวมไก่ที่ใช้ทั้งสิ้น 48 ตัว ทำการทดลองเป็นเวลานาน 21 วัน โดยกลุ่มทดลองประกอบด้วย

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ไก่ได้รับอาหารที่ไม่ผสมแบคทีเรียกรดแลคติก

กลุ่มที่ 2 ไก่ได้รับอาหารที่ผสมเชื้อ *Lb. plantarum* P6

กลุ่มที่ 3 ไก่ได้รับอาหารที่ผสมเชื้อ *Lb. paraplantarum* P25

กลุ่มที่ 4 ไก่ได้รับอาหารที่ผสมเชื้อ *Lb. reuteri* P30

กลุ่มที่ 5 ไก่ได้รับอาหารที่ผสมเชื้อ *Lb. plantarum* P6 และ *Lb. paraplantarum* P25

กลุ่มที่ 6 ไก่ได้รับอาหารที่ผสมเชื้อ *Lb. plantarum* P6 และ *Lb. reuteri* P30

กลุ่มที่ 7 ไก่ได้รับอาหารที่ผสมเชื้อ *Lb. paraplantarum* P25 และ *Lb. reuteri* P30

กลุ่มที่ 8 ไก่ได้รับอาหารที่ผสมเชื้อ*Lb. plantarum* P6, *Lb. paraplantarum* P25 และ *Lb. reuteri* P30

ทุกกลุ่มทดลองให้อาหารตามปริมาณที่กำหนด โดยให้ 2 ครั้งต่อวัน คือ เช้า (6.00 น.) และเย็น (18.00 น.) โดยทำการให้อาหารที่ผสมโปรไบโอติกแก่ ไก่ในช่วงอายุ 7-21 วันก่อน หลังนั้นให้อาหารที่ไม่ผสมโปรไปโอติก แก่ไก่ในช่วงอายุ 22-28 วัน ซึ่งอาหารไก่ จะแบ่งอาหารตามระยะการเจริญเติบโตของไก่ โดยแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ไก่เล็ก (starter) และไก่รุ่น (grower) ดังนี้

- อาหารไก่เล็ก (starter diet) ใช้เลี้ยงไก่ช่วงอายุ 1-18 วัน (อายุของไก่เมื่อเริ่มต้นการทดลอง คือ 7 วัน)
- อาหารไก่รุ่น (grower diet) ใช้เลี้ยงไก่ช่วงอายุ 19-30 วัน (ทำการทดลองเป็นเวลานาน 21 วัน ดังนั้น อายุของไก่ในวันสุดท้ายของการทดลอง คือ 28 วัน)

อุปกรณ์ให้อาหารแบบถาดอาหารสี่เหลี่ยมขนาดยาว 15 เซนติเมตร กว้าง 10 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตร อุปกรณ์ให้น้ำแบบถาดครึ่งวงกลมรัศมี 8 เซนติเมตร ขนาดกรงต่อตัวกว้าง 23 เซนติเมตร สูง 40 เซนติเมตร ลึก 40 เซนติเมตร สภาวะโรงเรือนแบบเปิด ดังภาพประกอบ 6

ภาพประกอบ 6 สภาวะโรงเรือนแบบเปิด

7. การเก็บข้อมูล

ข้อมูลที่เก็บบันทึก ประกอบด้วย

7.1 การเจริญเติบโต

โดยการชั่ง น้ำหนักของไก่ทั้งหมดในช่วง เริ่มต้นการทดลอง (อายุของไก่เริ่มต้น คือ 7 วัน) และติดตามการเจริญจาก น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นโดยชั่งทุก 3 วันของการทดลอง จนครบ 21 วัน นำน้ำหนักรวมของแต่ละซ้ำมาหาค่าเฉลี่ยแล้วคำนวณน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นในแต่ละช่วงเวลารวมทั้งเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ของน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น จากสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ของน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น} = \frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นในไก่กลุ่มทดลอง - น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นในไก่กลุ่มควบคุม}}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นในไก่กลุ่มทดลอง}} \times 100$$

7.2 อุณหภูมิในโรงเรือน

โดยที่วัดอุณหภูมิจากเทอร์โมมิเตอร์กระเปาะเปียกและกระเปาะแห้ง นำข้อมูลมาคำนวณความชื้นสัมพัทธ์โดยหาผลต่างอุณหภูมิจากเทอร์โมมิเตอร์กระเปาะเปียกและกระเปาะแห้งใน ช่วงเวลาเช้าและบ่าย แล้วเทียบค่าจากตารางเทียบค่าความชื้นสัมพัทธ์ (ภาคผนวก ค)

7.3 จำนวนของแบคทีเรีย

7.3.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

การนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก ทำได้โดยทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระ ของไก่ทุก 2 วัน นำอุจจาระไก่มาเจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นนำค่า ตัวอย่างที่มี ความเจือจางที่เหมาะสม มา 0.1 มิลลิลิตร ทำการ spread บนอาหาร MRS agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.5 และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน candle jar นับจำนวนโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) เกิดขึ้น

7.3.2 แบคทีเรียโคลิฟอร์ม

การนับจำนวน แบคทีเรียโคลิฟอร์ม ทำได้โดยนำอุจจาระไก่มาเจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นนำค่า ตัวอย่างที่มีความเจือจางที่เหมาะสม มา 0.1 มิลลิลิตร ทำการ spread บนอาหาร eosin-methylene blue (EMB) agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะมีออกซิเจน นับจำนวนโคโลนีที่มีการเจริญ

7.3.3 **แบคทีเรีย** *Salmonella* sp.

การนับจำนวนแบคทีเรีย ก่อโรค ทำได้โดยนำอุจจาระไก่มาเจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นนำค่าตัวอย่างที่มีความเจือจางที่เหมาะสม มา 0.1 มิลลิลิตร ทำการ spread บนอาหาร Salmonella-Shigella (SS) agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะมีออกซิเจน นับจำนวนโคโลนีที่มีสีดำ ซึ่งคาดว่าจะเป็น *Salmonella* sp.

8. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

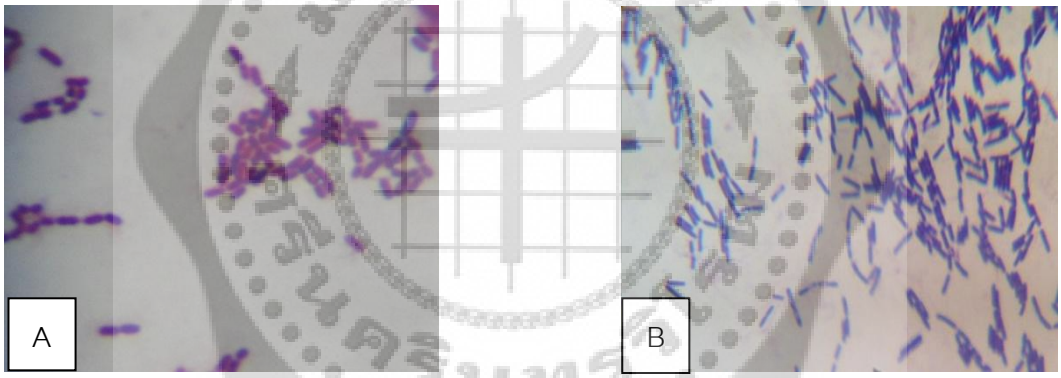
นำผลที่ได้ในแต่ละกลุ่มทดลอง มาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ ความแปรปรวน (analysis of variance) และลำดับความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มด้วยวิธี LSD (Fisher's Least Significant Different) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม SPSS version 20.0

บทที่ 4

ผลการศึกษา

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างอุจจาระจากสัตว์ ได้แก่ วัว หมู ไก่ และเป็ด ในฟาร์มต่างๆ จำนวน 150 ตัวอย่าง โดยคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนีบนอาหาร MRS agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ร้อยละ 0.5 นำมาย้อมสีแกรม แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ คัดเลือกเชื้อที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ (ภาพประกอบ 7) จากนั้นนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์ คะตะเลส คัดเลือกเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 81 ไอโซเลต โดยมีรูปร่างเป็น รูปท่อน 43 ไอโซเลต และรูปไข่ 38 ไอโซเลต ดังแสดงในตาราง 5 จากนั้นนำเชื้อทั้ง 81 ไอโซเลตมาศึกษาในขั้นต่อไป



ภาพประกอบ 7 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอุจจาระสัตว์

A. เซลล์รูปไข่ B. เซลล์รูปท่อน (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

ตาราง 5 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีบริเวณใสรอบโคโลนีบนอาหารแข็ง MRS ที่เติม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.5

วัน/เดือน/ปี	ตัวอย่างจาก	สถานที่เก็บ	ไอโซเลตที่แยกได้	รูปร่าง
30/10/53	วัว	พิษณุโลก	C1	รูปท่อน
30/10/53	วัว	พิษณุโลก	C2	รูปไข่
6/11/53	วัว	พิษณุโลก	C3	รูปท่อน
6/11/53	วัว	พิษณุโลก	C4	รูปไข่
6/11/53	วัว	พิษณุโลก	C5	รูปไข่
8/11/53	วัว	ลพบุรี	C6	รูปท่อน
8/11/53	วัว	ลพบุรี	C7	รูปไข่
13/11/53	วัว	นครปฐม	C8	รูปท่อน
13/11/53	วัว	นครปฐม	C9	รูปท่อน
13/11/53	วัว	นครปฐม	C10	รูปท่อน
30/10/53	ไก่	พิษณุโลก	K1	รูปไข่
30/10/53	ไก่	พิษณุโลก	K2	รูปไข่
6/11/53	ไก่	พิษณุโลก	K3	รูปท่อน
6/11/53	ไก่	พิษณุโลก	K4	รูปไข่
6/11/53	ไก่	พิษณุโลก	K5	รูปท่อน
21/11/53	ไก่	พิษณุโลก	K6	รูปท่อน
21/11/53	ไก่	พิษณุโลก	K7	รูปท่อน
21/11/53	ไก่	พิษณุโลก	K8	รูปไข่
21/11/53	ไก่	พิษณุโลก	K9	รูปท่อน
21/11/53	ไก่	พิษณุโลก	K10	รูปไข่
28/11/53	ไก่	นครปฐม	K11	รูปไข่
28/11/53	ไก่	นครปฐม	K12	รูปท่อน
28/11/53	ไก่	นครปฐม	K13	รูปท่อน
28/11/53	ไก่	นครปฐม	K14	รูปไข่

ตาราง 5 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี	ตัวอย่างจาก	สถานที่เก็บ	ไอโซเลตที่แยกได้	รูปร่าง
28/11/53	ไก่	นครปฐม	K15	รูปไข่
10/4/54	ไก่	นครปฐม	K16	รูปไข่
10/4/54	ไก่	นครปฐม	K17	รูปท่อน
10/4/54	ไก่	นครปฐม	K18	รูปไข่
10/4/54	ไก่	นครปฐม	K19	รูปท่อน
10/4/54	ไก่	นครปฐม	K20	รูปไข่
8/11/53	ไก่	ลพบุรี	K21	รูปท่อน
8/11/53	ไก่	ลพบุรี	K22	รูปท่อน
8/11/53	ไก่	ลพบุรี	K23	รูปไข่
8/11/53	ไก่	ลพบุรี	K24	รูปไข่
13/11/53	เป็ด	นครปฐม	D1	รูปไข่
13/11/53	เป็ด	นครปฐม	D2	รูปไข่
13/11/53	เป็ด	นครปฐม	D3	รูปท่อน
13/11/53	เป็ด	นครปฐม	D4	รูปท่อน
13/11/53	เป็ด	นครปฐม	D5	รูปไข่
21/11/53	เป็ด	พิษณุโลก	D6	รูปท่อน
21/11/53	เป็ด	พิษณุโลก	D7	รูปไข่
21/11/53	เป็ด	พิษณุโลก	D8	รูปท่อน
21/11/53	เป็ด	พิษณุโลก	D9	รูปท่อน
21/11/53	เป็ด	พิษณุโลก	D10	รูปท่อน
8/11/53	หมู	ลพบุรี	P1	รูปท่อน
8/11/53	หมู	ลพบุรี	P2	รูปท่อน
8/11/53	หมู	ลพบุรี	P3	รูปท่อน
8/11/53	หมู	ลพบุรี	P4	รูปไข่
8/11/53	หมู	ลพบุรี	P5	รูปไข่

ตาราง 5 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี	ตัวอย่างจาก	สถานที่เก็บ	ไอโซเลตที่แยกได้	รูปร่าง
24/11/53	หมู	พิษณุโลก	P6	รูปท่อน
24/11/53	หมู	พิษณุโลก	P7	รูปท่อน
24/11/53	หมู	พิษณุโลก	P8	รูปไข่
24/11/53	หมู	พิษณุโลก	P9	รูปไข่
24/11/53	หมู	พิษณุโลก	P10	รูปไข่
24/11/53	หมู	พิษณุโลก	P11	รูปไข่
24/11/53	หมู	พิษณุโลก	P12	รูปท่อน
24/11/53	หมู	พิษณุโลก	P13	รูปท่อน
24/11/53	หมู	พิษณุโลก	P14	รูปไข่
28/11/53	หมู	นครปฐม	P15	รูปท่อน
28/11/53	หมู	นครปฐม	P16	รูปไข่
28/11/53	หมู	นครปฐม	P17	รูปท่อน
28/11/53	หมู	นครปฐม	P18	รูปไข่
28/11/53	หมู	นครปฐม	P19	รูปท่อน
6/12/53	หมู	พิษณุโลก	P20	รูปท่อน
6/12/53	หมู	พิษณุโลก	P21	รูปไข่
6/12/53	หมู	พิษณุโลก	P22	รูปท่อน
6/12/53	หมู	พิษณุโลก	P23	รูปไข่
6/12/53	หมู	พิษณุโลก	P24	รูปท่อน
6/12/53	หมู	พิษณุโลก	P25	รูปท่อน
6/12/53	หมู	พิษณุโลก	P26	รูปไข่
6/12/53	หมู	พิษณุโลก	P27	รูปไข่
6/12/53	หมู	พิษณุโลก	P28	รูปท่อน
6/12/53	หมู	พิษณุโลก	P29	รูปไข่
8/4/54	หมู	พิษณุโลก	P30	รูปไข่

ตาราง 5 (ต่อ)

วัน/เดือน/ปี	ตัวอย่างจาก	สถานที่เก็บ	ไอโซเลตที่แยกได้	รูปร่าง
8/4/54	หมู	พิษณุโลก	P31	รูปท่อน
8/4/54	หมู	พิษณุโลก	P32	รูปไข่
8/4/54	หมู	พิษณุโลก	P33	รูปไข่
8/4/54	หมู	พิษณุโลก	P34	รูปท่อน
8/4/54	หมู	พิษณุโลก	P35	รูปท่อน
8/4/54	หมู	พิษณุโลก	P36	รูปท่อน
8/4/54	หมู	พิษณุโลก	P37	รูปท่อน

2. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

การคัดเลือกเบื้องต้น

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติก ที่แยกได้ทั้งหมด 81 ไอโซเลต มาทำการย้อมสีแกรม เพื่อดูลักษณะรูปร่าง เก็บเชื้อที่ติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์ และนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ได้ผลแสดงในตาราง 6 จากการทดลองพบว่าทั้ง 81 ไอโซเลต ติดสีแกรมบวก และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส จากนั้นนำเชื้อทั้ง 81 ไอโซเลตมาศึกษาในขั้นต่อไป

ตาราง 6 ลักษณะบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

ไอโซเลต	Catalase Test	Gram Stain
C1	-	Positive
C2	-	Positive
C3	-	Positive
C4	-	Positive
C5	-	Positive
C6	-	Positive
C7	-	Positive
C8	-	Positive

ตาราง 6 (ต่อ)

ไอโซเลต	Catalase Test	Gram Stain
C9	-	Positive
C10	-	Positive
D1	-	Positive
D2	-	Positive
D3	-	Positive
D4	-	Positive
D5	-	Positive
D6	-	Positive
D7	-	Positive
D8	-	Positive
D9	-	Positive
D10	-	Positive
K1	-	Positive
K2	-	Positive
K3	-	Positive
K4	-	Positive
K5	-	Positive
K6	-	Positive
K7	-	Positive
K8	-	Positive
K9	-	Positive
K10	-	Positive
K11	-	Positive
K12	-	Positive
K13	-	Positive

ตาราง 6 (ต่อ)

ไอโซเลต	Catalase Test	Gram Stain
K14	-	Positive
K15	-	Positive
K16	-	Positive
K17	-	Positive
K18	-	Positive
K19	-	Positive
K20	-	Positive
K21	-	Positive
K22	-	Positive
K23	-	Positive
K24	-	Positive
P1	-	Positive
P2	-	Positive
P3	-	Positive
P4	-	Positive
P5	-	Positive
P6	-	Positive
P7	-	Positive
P8	-	Positive
P9	-	Positive
P10	-	Positive
P11	-	Positive
P12	-	Positive
P13	-	Positive
P14	-	Positive

ตาราง 6 (ต่อ)

ไอโซเลต	Catalase Test	Gram Stain
P15	-	Positive
P16	-	Positive
P17	-	Positive
P18	-	Positive
P19	-	Positive
P20	-	Positive
P21	-	Positive
P22	-	Positive
P23	-	Positive
P24	-	Positive
P25	-	Positive
P26	-	Positive
P27	-	Positive
P28	-	Positive
P29	-	Positive
P30	-	Positive
P31	-	Positive
P32	-	Positive
P33	-	Positive
P34	-	Positive
P35	-	Positive
P36	-	Positive
P37	-	Positive

หมายเหตุ -: ให้ผลลบ

3. การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อที่แยกได้

3.1 การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ ทั้ง 81 ไอโซเลต มาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้วิธี agar spot test (Schillinger; & Lücke. 1989: 1901-1906) ได้ผลแสดงในตาราง 7 จากการทดลอง พบว่ามีเชื้อ 61 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง เชื้อ *E. coli* มีเชื้อ 43 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella* sp. มีเชื้อ 59 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง เชื้อ *S. aureus* มีเชื้อ 78 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Shigella* sp. และมีเชื้อ 79 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Klebsiella* sp. จากนั้นนำมาศึกษาในขั้นต่อไป

ตาราง 7 แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

ไอโซเลต	*E. coli*	*Salmonella* sp.	*S. aureus*	*Shigella* sp.	*Klebsiella* sp.
C1	-	++	+	+	+++
C2	++	+	+	-	++
C3	+	+	+	-	+
C4	+	+	+	-	+++
C5	+	++	+	+++	+++
C6	-	+	-	++	-
C7	-	-	-	++	+
C8	-	-	-	+	+
C9	++	-	-	++	+
C10	+++	+	+	++++	++
D1	+	+	+	++	+++
D2	+	+	+	+	+++
D3	-	-	+	+	+++
D4	-	-	+	+	+++
D5	+	+	-	+++	++
D6	+	-	+	++	+++
D7	-	++	-	+	+
D8	-	+	+	+	+++

ตาราง 7 (ต่อ)

ไอโซเลต	*E. coli*	*Salmonella* sp.	*S. aureus*	*Shigella* sp.	*Klebsiella* sp.
D9	-	+	+	+	+++
D10	+	-	+	+	+++
K1	-	+	+	+	+++
K2	+	+++	+	+	+++
K3	+	++	-	+	+++
K4	+	+	-	+	-
K5	-	+	-	+	+++
K6	+	++	+	+	++++
K7	-	-	+	+	+++
K8	-	-	+	+	+++
K9	+	-	+	+	+++
K10	-	+	++	+	++++
K11	+	+	++	+	++++
K12	-	+	+	+	++++
K13	-	-	+	+	+++
K14	-	-	+	+++	++
K15	+	++	+	+	+++
K16	++	++	+	++	++++
K17	-	++	++	+	++++
K18	-	++++	++	+++	++++
K19	+++	+	++	++	++++
K20	+++	+	+	++	+++
K21	+++	+	+	+	+++
K22	+++	+	+	+	+++
K23	+++	+	+	+	++++
K24	++	+	+	++	++++
P1	++	-	+	++	+++

ตาราง 7 (ต่อ)

ไอโซเลต	*E. coli*	*Salmonella* sp.	*S. aureus*	*Shigella* sp.	*Klebsiella* sp.
P2	++	-	+	++	+++
P3	+	-	+	+	++
P4	++	+	+	+	+++
P5	+	-	+	+	+++
P6	++	+++	+	+	+++
P7	+++	+	+	+	+++
P8	++	++	+	++	++++
P9	+++	+	-	+	++
P10	+	-	-	+	++
P11	+	-	+	++	+++
P12	++	+	+	+	++
P13	+	-	-	+	++
P14	+	-	-	+	++
P15	+	-	+	+	++
P16	+	-	-	+	++
P17	-	-	-	++	++
P18	+	-	+	++	++
P19	+	-	+	+	++
P20	+	-	+	+	++
P21	++	-	+	++	++
P22	++	-	+	++	++
P23	+	-	-	++	++
P24	-	-	-	++	++
P25	+	+++	+	++	+++
P26	+	-	+	+	++
P27	+	-	+	++	++
P28	+	-	+	+	++

ตาราง 7 (ต่อ)

ไอโซเลต	*E. coli*	*Salmonella* sp.	*S. aureus*	*Shigella* sp.	*Klebsiella* sp.
P29	++	-	+	+	++
P30	++	++	+	++	++++
P31	++	+++	+	+	+++
P32	+	-	-	++	++
P33	+	-	-	++	++
P34	+	-	-	+	++
P35	+++	+	+	+	++
P36	+++	+	+	+	+++
P37	+	-	-	++	++

หมายเหตุ เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง : ++++> 20 mm, +++> 15 mm, ++> 10 mm, +> 5 mm และ -< 5 mm

3.2 การศึกษาความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดี

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 81 ไอโซเลต มาศึกษาการเจริญในสภาวะที่ไม่เหมาะสม โดย การตรวจสอบ ความสามารถในการทนเกลือน้ำดี และความสามารถในการทนกรด ได้ผลดังแสดงในตาราง 8

ตาราง 8 แสดงความสามารถในการทนกรดและเกลือน้ำดี

ไอโซเลต	ความสามารถในการทนกรด		ความสามารถในการทนเกลือน้ำดี	
	pH 4	pH 3.5	0.3%	1.0%
C1	+++	+	++	+
C2	+++	++	+++	+++
C3	+	+	+++	+++
C4	+++	+++	+++	++
C5	+++	++	+++	+++

ตาราง 8 (ต่อ)

ไอโซเลต	ความสามารถในการทนกรด		ความสามารถในการทนเกลือน้ำดี	
	pH 4	pH 3.5	0.3%	1.0%
C6	+++	+++	+++	++
C7	+++	+++	+++	+++
C8	+++	+++	+++	+++
C9	+++	+++	+++	+++
C10	+++	+	+++	+++
D1	+++	+++	+++	+++
D2	+++	+++	+++	+++
D3	+++	++	+++	+++
D4	+++	++	+++	+++
D5	+++	+++	++	++
D6	+++	++	+++	+++
D7	+++	++	+++	+++
D8	+++	+++	+++	+++
D9	+++	+++	+++	+++
D10	+++	++	++	++
K1	+++	+	+++	+++
K2	+	+	+++	+++
K3	+++	+++	+++	+++
K4	+++	++	++	+
K5	+++	+++	+++	+++
K6	+++	++	+++	+++
K7	+++	+++	+++	+++
K8	+++	++	+++	+++
K9	+++	+++	+++	+++
K10	+	+	+++	+++
K11	+++	++	+++	+++

ตาราง 8 (ต่อ)

ไอโซเลต	ความสามารถในการทนกรด		ความสามารถในการทนเกลือน้ำดี	
	pH 4	pH 3.5	0.3%	1.0%
K12	+	+	+++	+++
K13	+++	++	+++	+
K14	+++	+++	+++	+++
K15	+++	+++	++	++
K16	+++	++	++	++
K17	+++	++	+++	+++
K18	+++	+++	+++	+++
K19	+++	++	+++	+++
K20	+++	+++	+++	+++
K21	+++	+++	+++	+++
K22	+++	++	++	+
K23	++	++	++	++
K24	++	++	++	++
P1	+++	+++	+++	+++
P2	+++	+++	+++	+++
P3	+	+	+++	+++
P4	++	++	+++	+
P5	++	++	+++	+++
P6	+++	++	+++	+++
P7	+++	+++	+++	+
P8	+++	+++	+++	+++
P9	+++	+++	+++	+++
P10	+	+	+++	+++
P11	++	+	+++	+++
P12	+++	+++	+++	+++
P13	+	+	+++	+++

ตาราง 8 (ต่อ)

ไอโซเลต	ความสามารถในการทนกรด		ความสามารถในการทนเกลือน้ำดี	
	pH 4	pH 3.5	0.3%	1.0%
P14	+++	+	+++	+++
P15	+++	++	+++	+++
P16	++	+	++	+
P17	+	+	+++	+++
P18	+++	+++	+++	+++
P19	+++	++	+++	++
P20	+++	++	+++	+++
P21	+++	+++	+++	+++
P22	+++	+++	++	+
P23	+	+	+++	+++
P24	+++	++	+++	+++
P25	+++	++	+++	+++
P26	+++	++	+++	+++
P27	+++	++	+++	+++
P28	+++	+++	+++	+++
P29	+++	++	+++	++
P30	++	++	++	++
P31	++	++	+++	++
P32	+	+	+++	+++
P33	+++	+	++	+
P34	++	+	++	+
P35	+++	+++	+++	++
P36	+++	++	++	+
P37	+++	++	+++	++

หมายเหตุ +: เจริญได้เล็กน้อย, ++: เจริญได้ดี และ +++: เจริญได้ดีมากเหมือนกับ control

3.3 การศึกษาความมีขั้ว – ไม่มีขั้วโดยใช้ไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้ว เพื่อดูคุณสมบัติการเกาะติดลำไส้

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้มา ศึกษาค วามมีขั้ว –ไม่มีขั้ว เพื่อดูคุณสมบัติการเกาะติดลำไส้ ซึ่งการเกาะติดของแบคทีเรียกรดแลคติก จะอาศัยคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำ ซึ่งในการทดสอบจะใช้ ไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้ว ได้แก่ hexadecane จากนั้นนำมาคำนวณ Percent Hydrophobicity Index (HPBI) ได้ผลดังแสดงในตาราง 9 ซึ่งจากการทดลอง พบว่า 12 ไอโซเลต สามารถเกาะติดลำไส้ได้ดีมาก มีเชื้อ 2 ไอโซเลตสามารถเกาะติดลำไส้ได้ดี และ 67 ไอโซเลตสามารถเกาะติดลำไส้ได้น้อย จากนั้นนำเชื้อที่สามารถ เกาะติดลำไส้ได้ดีมาก ทั้ง 12 ไอโซเลตมาศึกษาในขั้นต่อไป

ตาราง 9 ผลการศึกษาความมีขั้ว – ไม่มีขั้วโดยใช้ไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้ว เพื่อดูคุณสมบัติการเกาะติดลำไส้

ไอโซเลต	HPBI (%)	Adhesion Efficiency
C1	9.38	+
C2	4.45	+
C3	8.69	+
C4	7.08	+
C5	30.86	+
C6	3.19	+
C7	0.98	+
C8	8.18	+
C9	0.18	+
C10	2.25	+
D1	0.18	+
D2	6.85	+
D3	0.18	+
D4	1.24	+
D5	9.06	+
D6	1.86	+

ตาราง 9 (ต่อ)

ไอโซเลต	HPBI (%)	Adhesion Efficiency
D7	14.68	+
D8	1.68	+
D9	7.06	+
D10	4.68	+
K1	0.18	+
K2	9.86	+
K3	1.60	+
K4	2.25	+
K5	4.24	+
K6	0.36	+
K7	8.11	+
K8	2.59	+
K9	10.30	+
K10	0.18	+
K11	5.74	+
K12	9.34	+
K13	25.23	+
K14	0.19	+
K15	7.18	+
K16	90.99	+++
K17	4.19	+
K18	21.79	+
K19	10.02	+
K20	2.19	+
K21	8.45	+
K22	4.43	+
K23	3.29	+

ตาราง 9 (ต่อ)

ไอโซเลต	HPBI (%)	Adhesion Efficiency
K24	1.24	+
P1	51.70	++
P2	6.47	+
P3	10.85	+
P4	3.29	+
P5	80.47	+++
P6	96.81	+++
P7	81.58	+++
P8	90.27	+++
P9	83.55	+++
P10	88.80	+++
P11	32.54	+
P12	25.09	+
P13	7.58	+
P14	9.81	+
P15	20.00	+
P16	25.23	+
P17	1.85	+
P18	80.22	+++
P19	2.95	+
P20	24.15	+
P21	42.51	+
P22	34.68	+
P23	4.71	+
P24	3.33	+
P25	79.72	+++
P26	59.60	++

ตาราง 9 (ต่อ)

ไอโซเลต	HPBI (%)	Adhesion Efficiency
P27	84.36	+++
P28	43.37	+
P29	30.86	+
P30	95.03	+++
P31	90.38	+++
P32	32.97	+
P33	8.89	+
P34	9.06	+
P35	43.49	+
P36	40.47	+
P37	38.46	+

หมายเหตุ +: HPBI< 50%, ++: HPBI 50-70%, +++: HPBI> 70%

จากผลการทดลองคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ จึงได้ทำการคัดเลือกไอโซเล ต K16, P6, P8, P25, P30 และ P31 ซึ่งสามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียได้ สามารถ เจริญได้ในสภาวะ ที่ไม่เหมาะสม โดย การตรวจสอบก ารเจริญในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี ความเป็นกรดสูง และมีคุณสมบัติการเกาะติดลำไส้ ได้ดีมาก ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้เป็นโปรไบโอติก ดังแสดงในตาราง 10

ตาราง 10 ลักษณะบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

ไอโซเลต	Catalase	Gram	การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค					pH		Bile-salt		HPBI (%)	Adhesion
	test	stain	*E. coli*	*Salmonella* sp.	*S. aureus*	*Shigella* sp.	*Klebsiella* sp.	4	3.5	0.3%	1.0%		efficiency
K16	-	Positive	++	++	+	++	++++	+++	++	++	++	90.99	+++
P6	-	Positive	++	+++	+	+	+++	+++	++	+++	+++	96.81	+++
P8	-	Positive	++	++	+	++	++++	+++	+++	+++	+++	90.27	+++
P25	-	Positive	+	+++	+	++	+++	+++	++	+++	+++	91.72	+++
P30	-	Positive	++	++	+	++	++++	++	++	++	++	95.03	+++
P31	-	Positive	++	+++	+	+	+++	++	++	+++	++	90.38	+++

4. การจำแนกสปีชีส์โดยศึกษาลำดับเบสในบริเวณ 16S rDNA

เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอของ ไอโซเลท K16, P6, P8, P25, P30 และ P31 แล้วนำไปเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยการทำ PCR พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (base pair; bp) ภาพประกอบ 8 และเมื่อนำมาจำแนกสปีชีส์โดยเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล GenBank ได้ผลดังนี้

1. ไอโซเลต K16 (1,472 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. reuteri* (GenBank accession number: KC700337) ร้อยละ 99 และเมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ Type strain *Lb. reuteri* DSM20016T ผลการเทียบเคียงแสดงดังภาคผนวก ฉ ข้อ 1

2. ไอโซเลต P6 (1,531 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. plantarum* (GenBank accession number: KC700341) ร้อยละ 100 และเมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ Type strain *Lb. plantarum* WCFS1 ผลการเทียบเคียงแสดงดังภาคผนวก ฉ ข้อ 2

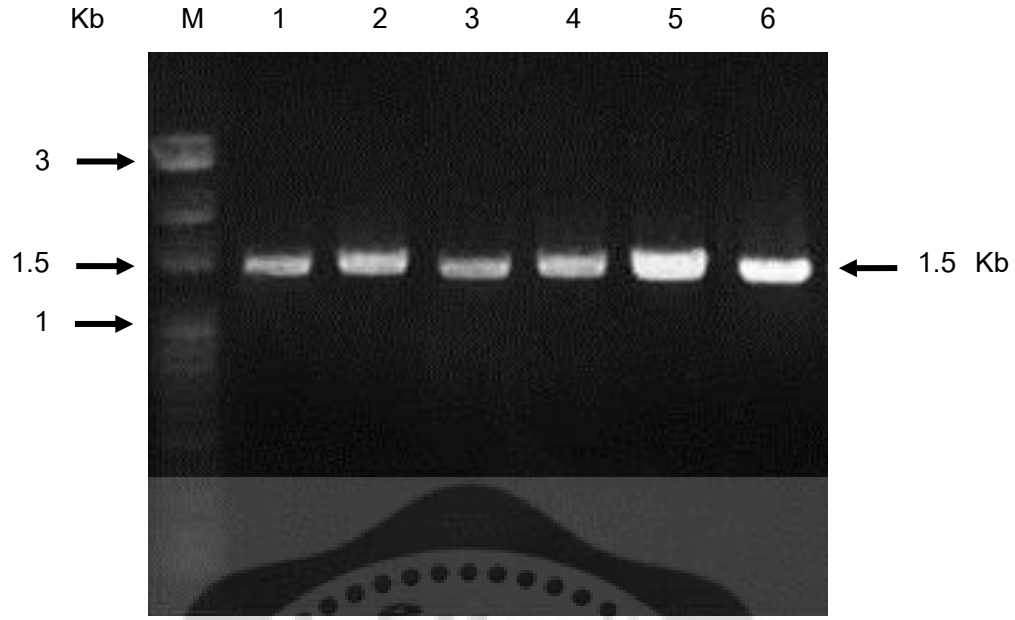
3. ไอโซเลต P8 (1,485 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. reuteri* (GenBank accession number: KC700338) ร้อยละ 100 และเมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ Type strain *Lb. reuteri* DSM20016T ผลการเทียบเคียงแสดงดังภาคผนวก ฉ ข้อ 3

4. ไอโซเลต P25 (1,520 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. paraplantarum* (GenBank accession number: KC700340) ร้อยละ 100 และเมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ Type strain *Lb. paraplantarum* DSM10667T ผลการเทียบเคียงแสดงดังภาคผนวก ฉ ข้อ 4

5. ไอโซเลต P30 (1,445 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. reuteri* (GenBank accession number: KC700339) ร้อยละ 100 และเมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ Type strain *Lb. reuteri* DSM20016T ผลการเทียบเคียงแสดงดังภาคผนวก ฉ ข้อ 5

6. ไอโซเลต P31 (1,529 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ*Lb. plantarum* (GenBank accession number: KC700342) ร้อยละ 100 และเมื่อนำลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ของ Type strain *Lb. plantarum* WCFS1 ผลการเทียบเคียงแสดงดังภาคผนวก ฉ ข้อ 6

จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่จัดจำแนกแล้วทั้ง 3 สายพันธุ์ซึ่งต่างสปีชีส์กันและมีความโดดเด่นในคุณสมบัติต่างๆ คือ *Lb. plantarum* P6, *Lb. paraplantarum* P25 และ *Lb. reuteri* P30 ไปทดลองในขั้นต่อไป

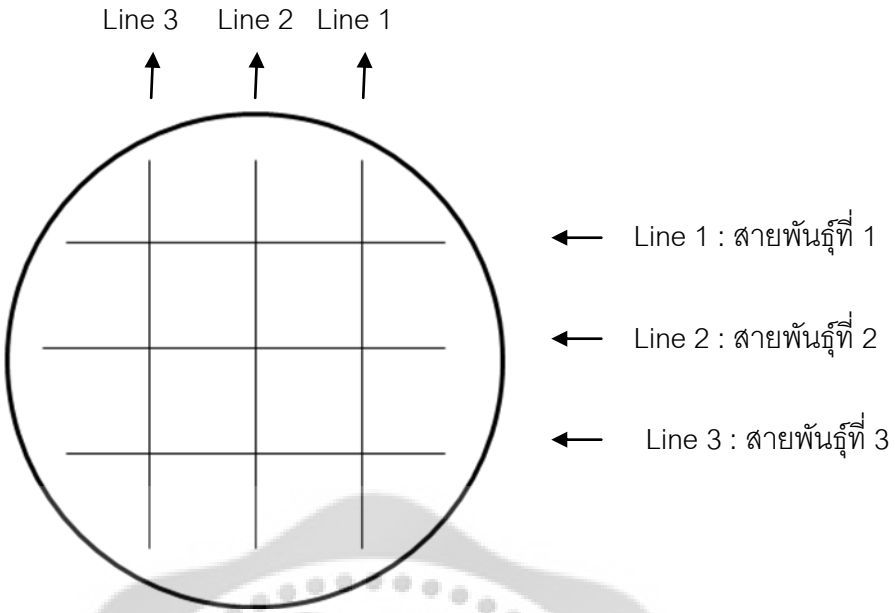


ภาพประกอบ 8 บริเวณ 16S rDNA ขนาด 1,500 คู่เบส ของเชื้อ 6 ไอโซเลต จากการทำ PCR

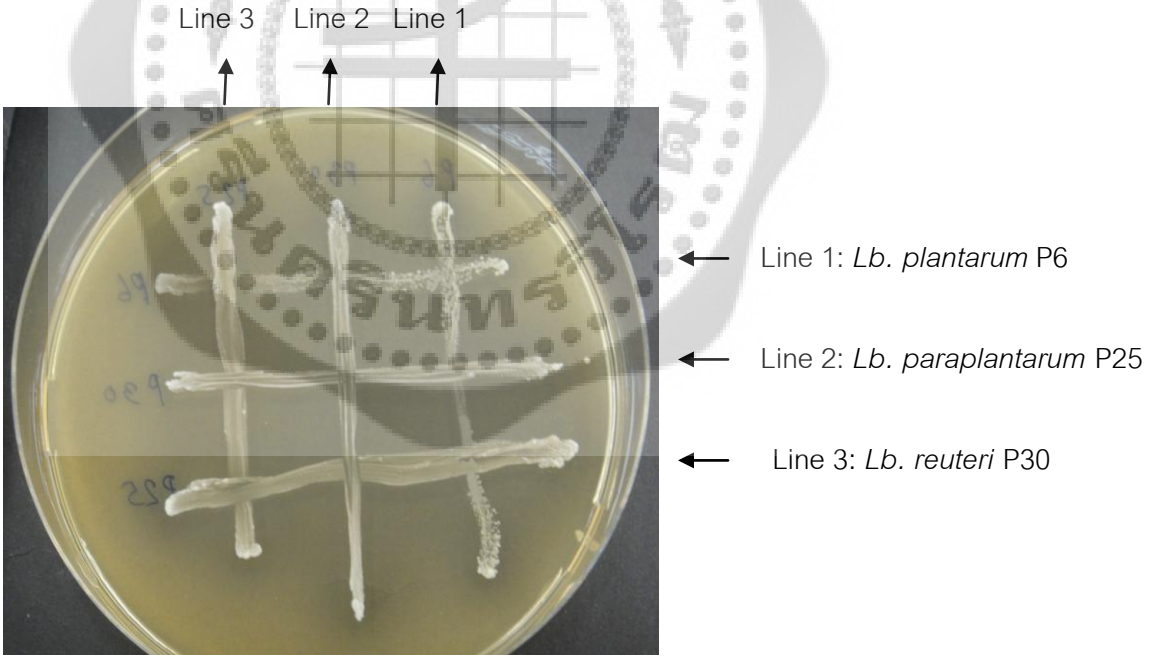
Lane M: 2-Log DNA Ladder marker
Lane 1: ไอโซเลต K16
Lane 2: ไอโซเลต P6
Lane 3: ไอโซเลต P8
Lane 4: ไอโซเลต P25
Lane 5: ไอโซเลต P30
Lane 6: ไอโซเลต P31

5. การทดสอบการอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก (Coexistence test) เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกสายพันธุ์ผสม

การทดสอบ การอยู่ร่วมกัน ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก ทำได้โดยใช้วิธีของเดเชล (Daeschel. 1992: 57- 80) โดยนำเชื้อ *Lb. plantarum* P6, *Lb. paraplantarum* P25 และ *Lb. reuteri* P30 มาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ในแนวตั้งแล้วขีดอีกครั้งในแนวที่ตั้งฉากกัน (ภาพประกอบ 9) พบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถอยู่ร่วมกันได้โดยไม่มีการยับยั้งกันเอง ได้ผลดังแสดงในภาพประกอบ 10



ภาพประกอบ 9 การทดสอบการอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก

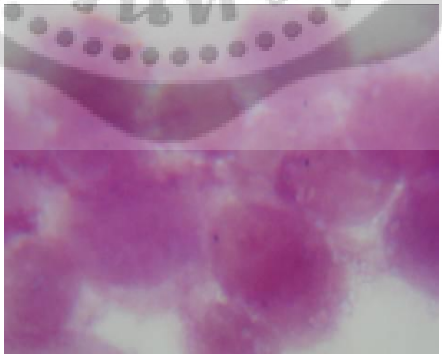


ภาพประกอบ 10 ผลการทดสอบการอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก

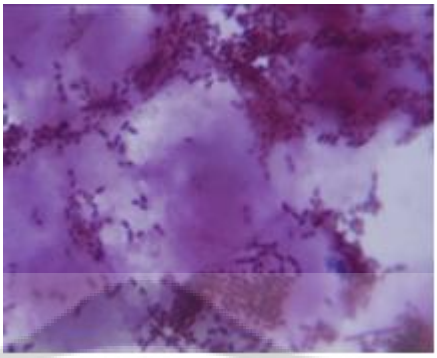
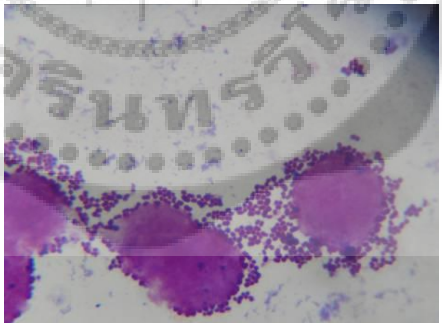
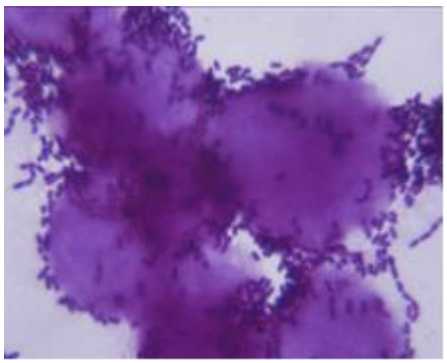
6. การศึกษาความสามารถในการเกาะติดลำไส้โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

จากผลการทดสอบการอยู่ร่วมกันระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือก ก 3 สายพันธุ์ คือ *Lb. plantarum* P6, *Lb. paraplantarum* P25 และ *Lb. reuteri* P30 มาทำการศึกษาความสามารถในการเกาะติดลำไส้โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง โดยใช้จุลินทรีย์ทั้งสายพันธุ์เดี่ยวและสายพันธุ์ผสม โดยเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบ คุมซึ่งไม่ใส่แบคทีเรียกรดแลคติก และกลุ่ม negative control ที่ใส่เชื้อ *Bacillus megaterium* จากการทดลอง พบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสายพันธุ์เดี่ยวและสายพันธุ์ผสมสามารถเกาะติดลำไส้ได้ดีมาก ดังตาราง 11

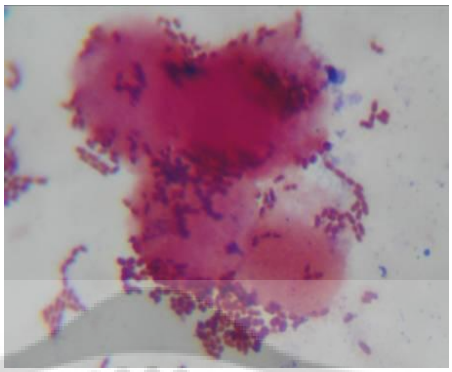
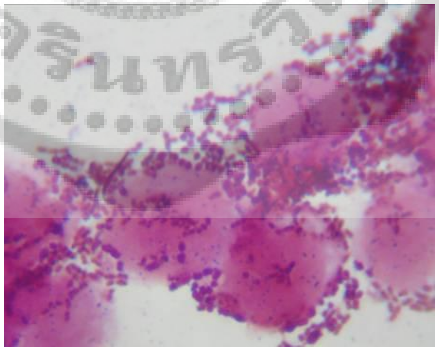
ตาราง 11 แสดงการเกาะติดลำไส้โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง

กลุ่มทดลอง	การเกาะติดเซลล์เพาะเลี้ยง	Adhesion Efficiency
COLO 205 (epithelial; colorectal adenocarcinoma)		control
Bacillus megaterium		-

ตาราง 11 (ต่อ)

กลุ่มทดลอง	การเกาะติดเซลล์เพาะเลี้ยง	Adhesion Efficiency
Lactobacillus plantarum P6		+++
Lactobacillus paraplantarum P25		+++
Lactobacillus reuteri P30		+++
Lactobacillus plantarum P6 + *Lactobacillus paraplantarum* P25		+++

ตาราง 11 (ต่อ)

กลุ่มทดลอง	การเกาะติดเซลล์เพาะเลี้ยง	Adhesion Efficiency
Lactobacillus plantarum P6 + *Lactobacillus reuteri* P30		+++
Lactobacillus paraplantarum P25 + *Lactobacillus reuteri* P30		+++
Lactobacillus plantarum P6 + *Lactobacillus paraplantarum* P25 + *Lactobacillus reuteri* P30		+++

หมายเหตุ -: ไม่สามารถเกาะติดเซลล์ได้ , +: เกาะติดเซลล์ได้เล็กน้อย , ++: เกาะติดเซลล์ได้ดี , +++: เกาะติดเซลล์ได้ดีมาก

7. การผลิตอาหารไก่เสริมโปรไบโอติกในรูปเชื้อสด

เมื่อทำการ ผสมเซลล์แบคทีเรีย กรดแลคติก ในอาหารไก่ เนื้อแล้ว จากนั้น ทำการ ตรวจนับปริมาณเซลล์ ที่มีชีวิตในอาหารไก่เนื้อ พบว่า ปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกลดลงตลอดการทดลอง โดยในวันที่ 6 จะพบว่าปริมาณเซลล์ที่ตรวจพบต่ำกว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้นประมาณ 1- 2 log cycle จึงเลือกใช้อาหารถึงวันที่ 3 เนื่องจากยังมีปริมาณเซลล์ ที่เหมาะสมสำหรับการป้อนให้ไก่และจำนวนเซลล์ที่อยู่รอดใ นลำไส้ไก่ต้องมีระดับที่สูง (10^7 CFU/g) (ฐิติพงษ์ ธนะรัชติการนนท์ . 2539) กล่าวคือ ยังคงเป็นปริมาณที่ยอมรับในการนำไปใช้เป็นโปรไบโอติก ได้ผลดังแสดงในตาราง 12 และภาพประกอบ 11 ดังนั้นนำอาหารที่เตรียมได้ไปทดสอบใช้จริงในภาคสนามต่อไป

โดยกลุ่มทดลองที่ 1 กลุ่มควบคุม อาหารที่ไม่ผสมแบคทีเรียกรดแลคติก

กลุ่มทดลองที่ 2 อาหารที่ผสมเชื้อ *Lb. plantarum* P6

กลุ่มทดลองที่ 3 อาหารที่ผสมเชื้อ *Lb. paraplantarum* P25

กลุ่มทดลองที่ 4 อาหารที่ผสมเชื้อ *Lb. reuteri* P30

กลุ่มทดลองที่ 5 อาหารที่ผสมเชื้อ *Lb. plantarum* P6 และ *Lb. paraplantarum* P25

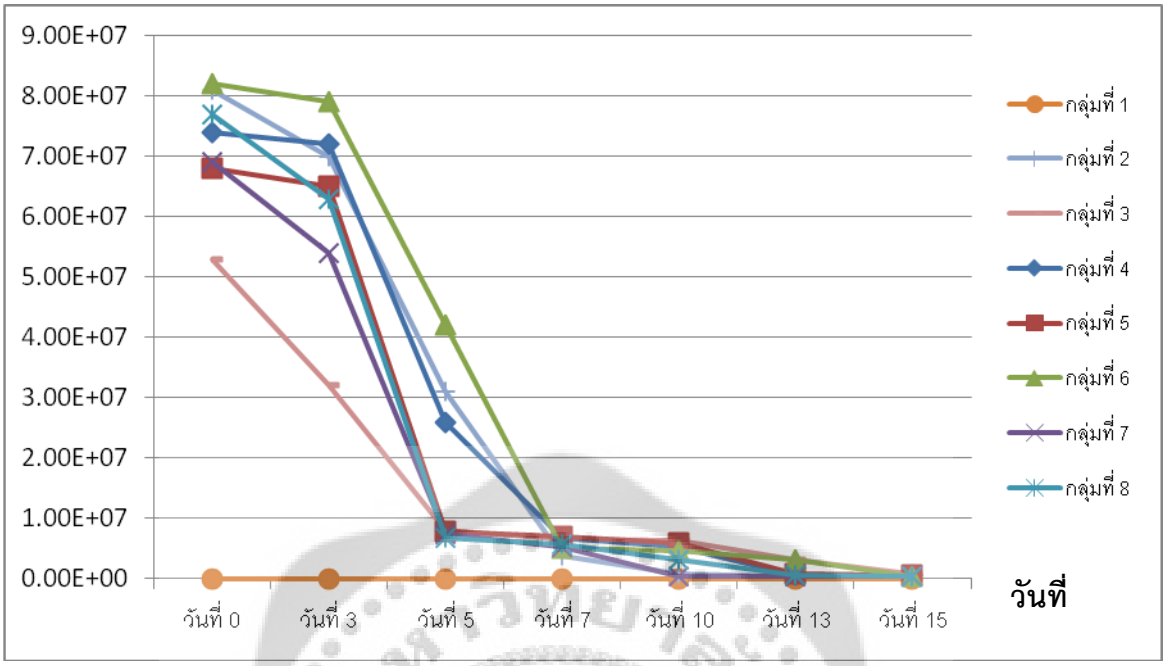
กลุ่มทดลองที่ 6 อาหารที่ผสมเชื้อ *Lb. plantarum* P6 และ *Lb. reuteri* P30

กลุ่มทดลองที่ 7 อาหารที่ผสมเชื้อ *Lb. paraplantarum* P25 และ *Lb. reuteri* P30

กลุ่มทดลองที่ 8 อาหารที่ผสมเชื้อ *Lb. plantarum* P6, *Lb. paraplantarum* P25 และ *Lb. reuteri* P30

ตาราง 12 ปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารไก่เนื้อ

กลุ่มทดลอง	ปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกใน 1 กรัมอาหาร (CFU/g)						
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 6	วันที่ 9	วันที่ 12	วันที่ 15	วันที่ 17
1	40	20	0	10	0	0	0
2	$8.1x10^7$	$7.0x10^7$	$3.1x10^7$	$3.8x10^6$	$8.7x10^5$	$4.5x10^5$	$3.0x10^5$
3	$5.3x10^7$	$3.2x10^7$	$8.1x10^6$	$6.5x10^6$	$6.4x10^6$	$3.1x10^6$	$7.2x10^5$
4	$7.4x10^7$	$7.2x10^7$	$2.6x10^7$	$6.7x10^6$	$5.3x10^6$	$6.0x10^5$	$5.5x10^5$
5	$6.8x10^7$	$6.5x10^7$	$7.8x10^6$	$6.9x10^6$	$5.9x10^6$	$7.3x10^5$	$6.3x10^5$
6	$8.2x10^7$	$7.9x10^7$	$4.2x10^7$	$5.1x10^6$	$4.6x10^6$	$3.1x10^6$	$4.7x10^5$
7	$6.9x10^7$	$5.4x10^7$	$7.4x10^6$	$5.2x10^6$	$4.1x10^5$	$3.3x10^5$	$3.0x10^5$
8	$7.7x10^7$	$6.3x10^7$	$6.7x10^6$	$5.7x10^6$	$3.2x10^6$	$6.5x10^5$	$4.3x10^5$



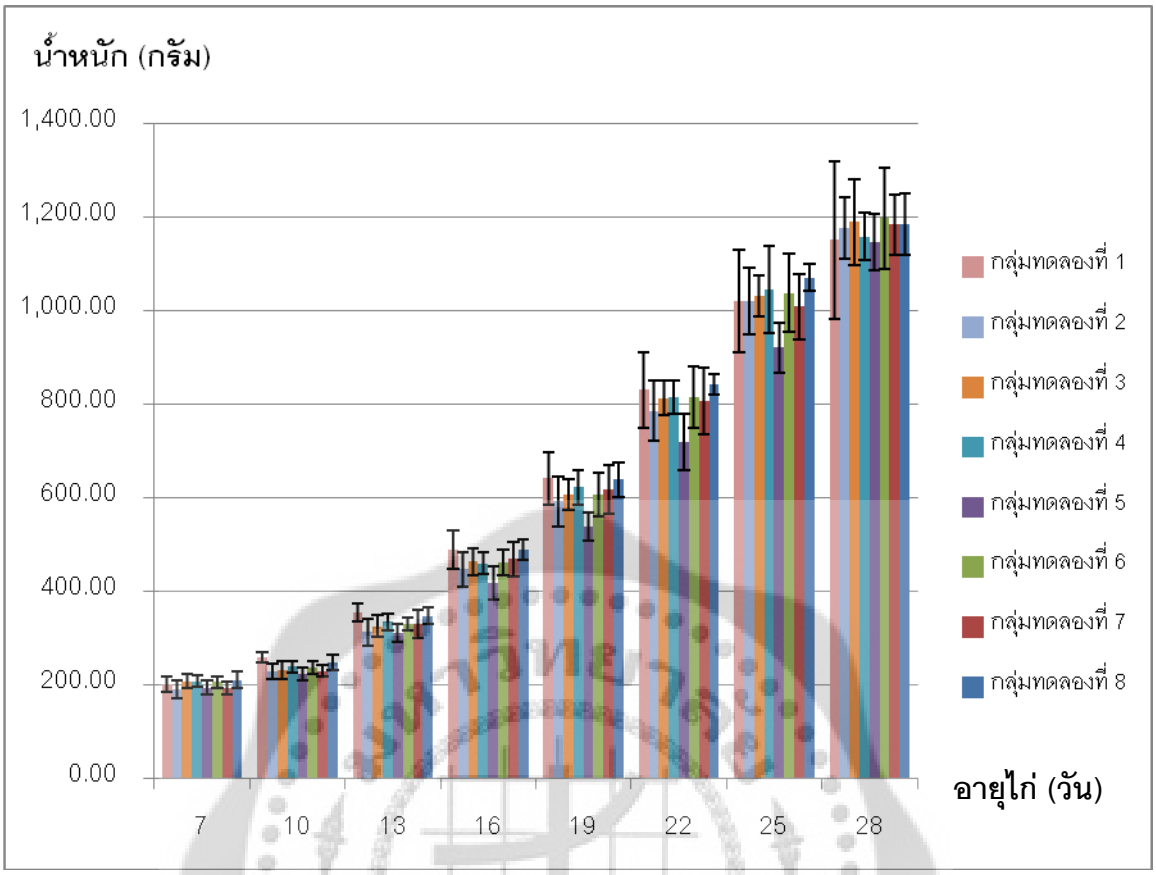
ภาพประกอบ 11 แสดงปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารไก่เนื้อ

8. การทดสอบภาคสนามเพื่อตรวจสอบผลของโปรไบโอติกต่อการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ

8.1 การศึกษาผลของโปรไบโอติกในอาหารไก่เนื้อ

เมื่อทำการทดลองภาคสนามโดยใช้ไก่เนื้อพันธุ์ Ross308 อายุ 7 วัน วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 8 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีไก่ 6 ตัว รวมไก่ที่ใช้ทั้งสิ้น 48 ตัว ทำการทดลองเป็นเวลานาน 21 วัน ทำการเก็บข้อมูลเจริญเติบโตโดยการชั่งน้ำหนักของไก่ทั้งหมดในช่วงเริ่มต้นการทดลอง (อายุของไก่เมื่อเริ่มต้นการทดลอง คือ 7 วัน) และติดตามการเจริญจากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นโดยชั่งทุก 3 วันของการทดลอง จนครบ 21 วัน (อายุของไก่ในวันสุดท้ายของการทดลอง คือ 28 วัน) พบว่า น้ำหนักไก่ในกลุ่มทดลองที่ 2, 3, 4, 6, 7 และ 8 เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมโดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่ในกลุ่มทดลองที่ 5 มีน้ำหนักลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมโดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ได้ผลดังแสดงในภาพประกอบ 12

เมื่อนำน้ำหนักรวมของแต่ละซ้ำมาหาค่าเฉลี่ยแล้วคำนวณน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นในแต่ละช่วงเวลารวมทั้งเปอร์เซ็นต์ความสัม พันธ์ของน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น พบว่า ในทุกกลุ่มทดลองมีเปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ของน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นทุกกลุ่มทดลอง ดังแสดงในตาราง 13



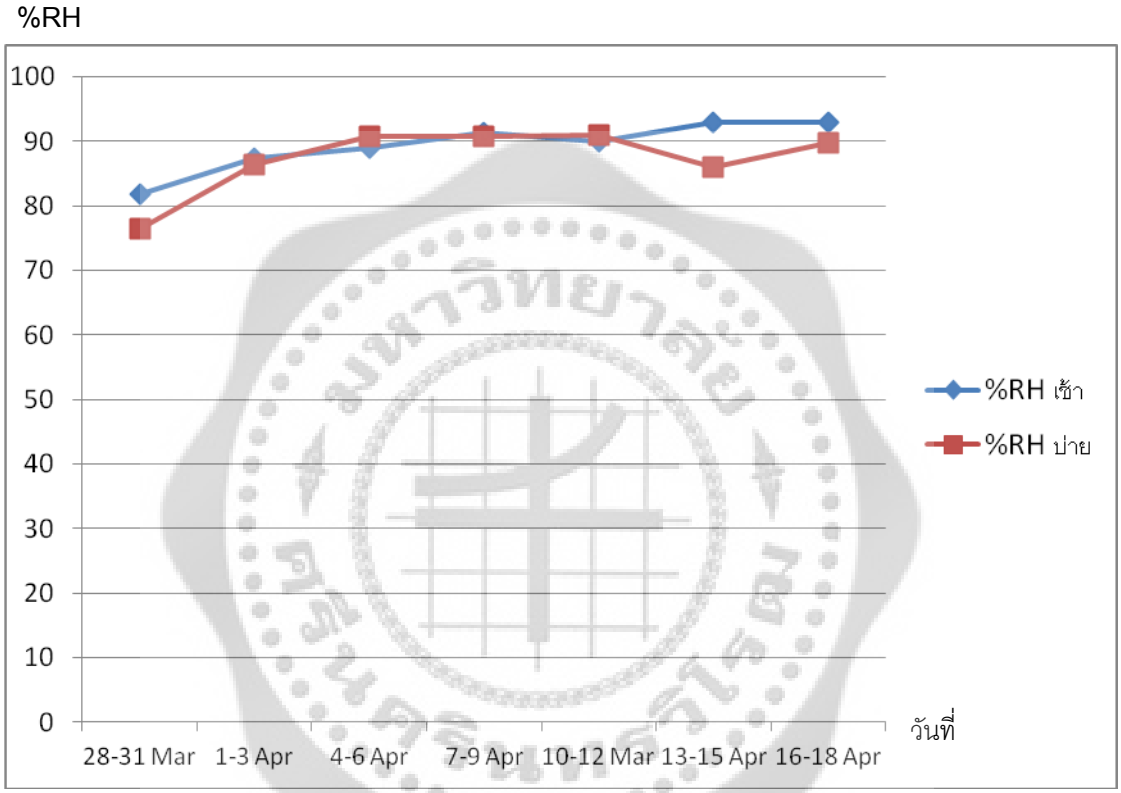
ภาพประกอบ 12 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักของไก่ทั้งหมด

ตาราง 13 เปอร์เซ็นต์ความสัมพันธ์ของน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้น

กลุ่มทดลองที่	น้ำหนักเฉลี่ยของไก่เมื่ออายุ 28 วัน	เปอร์เซ็นความสัมพันธ์ของน้ำหนักเฉลี่ย
1	1150	-
2	1175	2.13
3	1189.16	3.29
4	1157.5	0.65
5	1145	-0.44
6	1196.67	3.90
7	1183.34	2.82
8	1183.34	2.82

8.2 อุณหภูมิในโรงเรือน

เมื่อวัดอุณหภูมิจากเทอร์โมมิเตอร์กระเปาะเปียกและกระเปาะแห้ง นำข้อมูลมาคำนวณความชื้นสัมพัทธ์โดยหาผลต่างอุณหภูมิจากเทอร์โมมิเตอร์กระเปาะเปียกและกระเปาะแห้งในช่วงเวลาเช้า (7.00 น.) และบ่าย (15.00 น.) แล้วเทียบค่าจากตารางเทียบค่าความชื้น สัมพัทธ์ พบว่าปริมาณความชื้นสัมพัทธ์มีค่าใกล้เคียงกันในทุกวันของการทดลอง ดังแสดงในภาพประกอบ 13 และตาราง 14



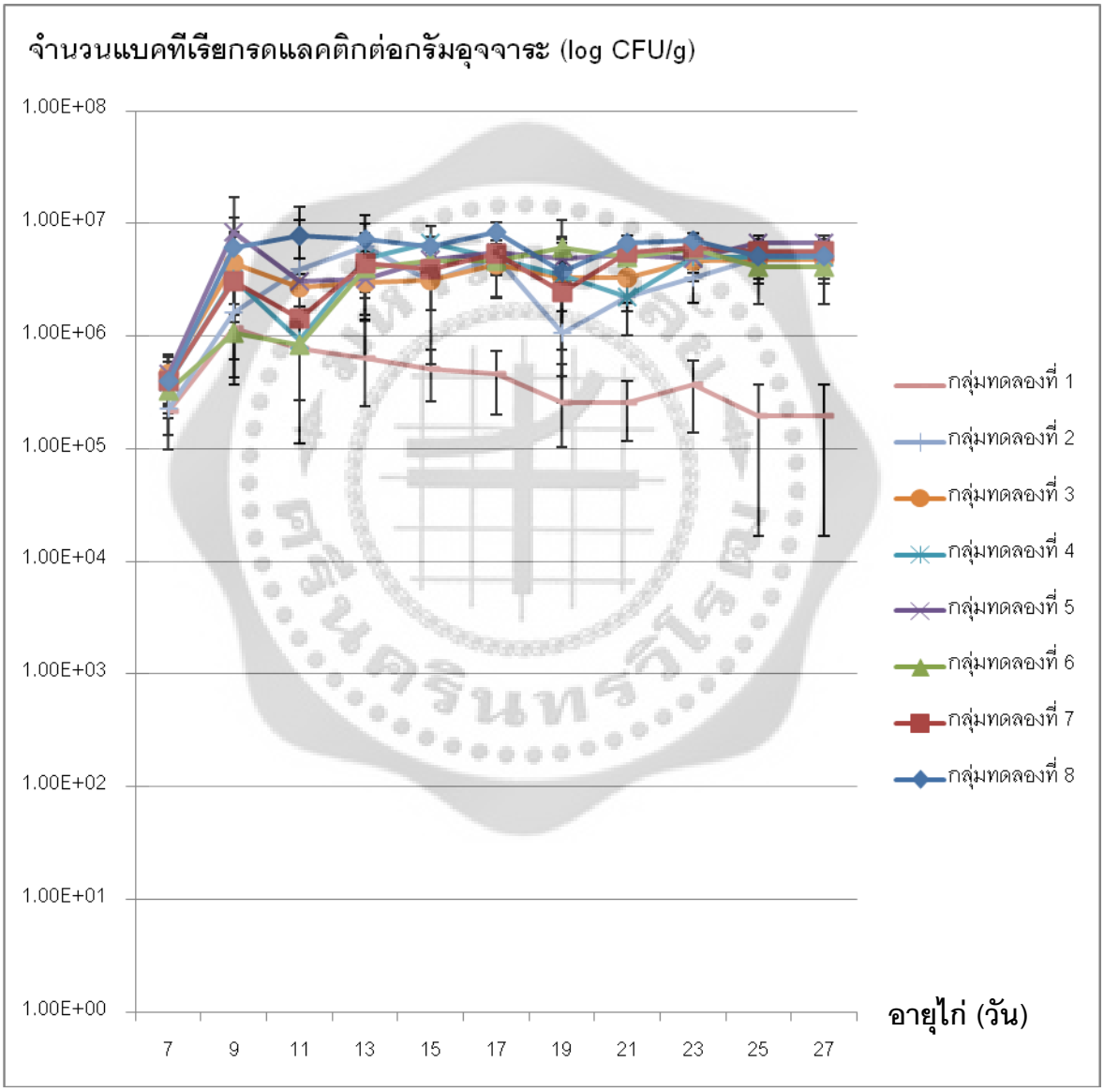
ภาพประกอบ 13 แสดงปริมาณความชื้นสัมพัทธ์

ตาราง 14 อุณหภูมิจากเทอร์โมมิเตอร์กระเปาะเปียกและกระเปาะแห้ง

	กระเปาะแห้ง ^{O}C		กระเปาะเปียก ^{O}C				%RH	
วันที่	**เช้า**	**บ่าย**	**เช้า**	**บ่าย**	Difference		**เช้า**	**บ่าย**
28-Mar	27	35	23	28	4	7	71	60
29-Mar	23	35	22	28	1	7	92	60
30-Mar	27	29	26	28	1	1	93	93
31-Mar	27	29	23	28	4	1	71	93
28-31 Mar	**26**	**32**	**23.5**	**28**	**2.5**	**4**	**81.75**	**76.5**
1-Apr	25	29	23	28	2	1	85	93
2-Apr	25	30	23	28	2	2	85	86
3-Apr	24	34	23	31	1	3	92	80
1-3 Apr	**24.67**	**31**	**23**	**29**	**1.67**	**2**	**87.33**	**86.33**
4-Apr	24	34	23	33	1	1	92	93
5-Apr	23	34	21	33	2	1	83	93
6-Apr	24	32	23	30	1	2	92	86
4-6 Apr	**23.67**	**33.33**	**22.33**	**32**	**1.33**	**1.33**	**89**	**90.67**
7-Apr	23	30	22	28	1	2	92	86
8-Apr	22	30	21	29	1	1	92	93
9-Apr	19	33	18	32	1	1	90	93
7-9 Apr	**21.33**	**31**	**20.33**	**29.67**	**1**	**1.33**	**91.33**	**90.67**
10-Apr	24	34	23	32	1	2	92	86
11-Apr	25	37	24	36	1	1	93	94
12-Apr	27	33	25	32	2	1	85	93
10-12 Mar	**25.33**	**34.67**	**24**	**33.33**	**1.33**	**1.33**	**90**	**91**
13-Apr	26	35	25	33	1	2	93	88
14-Apr	26	36	25	34	1	2	93	88
15-Apr	27	36	26	33	1	3	93	82
13-15 Apr	**26.33**	**35.67**	**25.33**	**33.33**	**1**	**2.33**	**93**	**86**
16-Apr	26	35	25	33	1	2	93	88
17-Apr	26	35	25	33	1	2	93	88
18-Apr	27	33	26	32	1	1	93	93
16-18 Apr	**26.33**	**34.33**	**25.33**	**32.67**	**1**	**1.67**	**93**	**89.67**

8.3 จำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติก

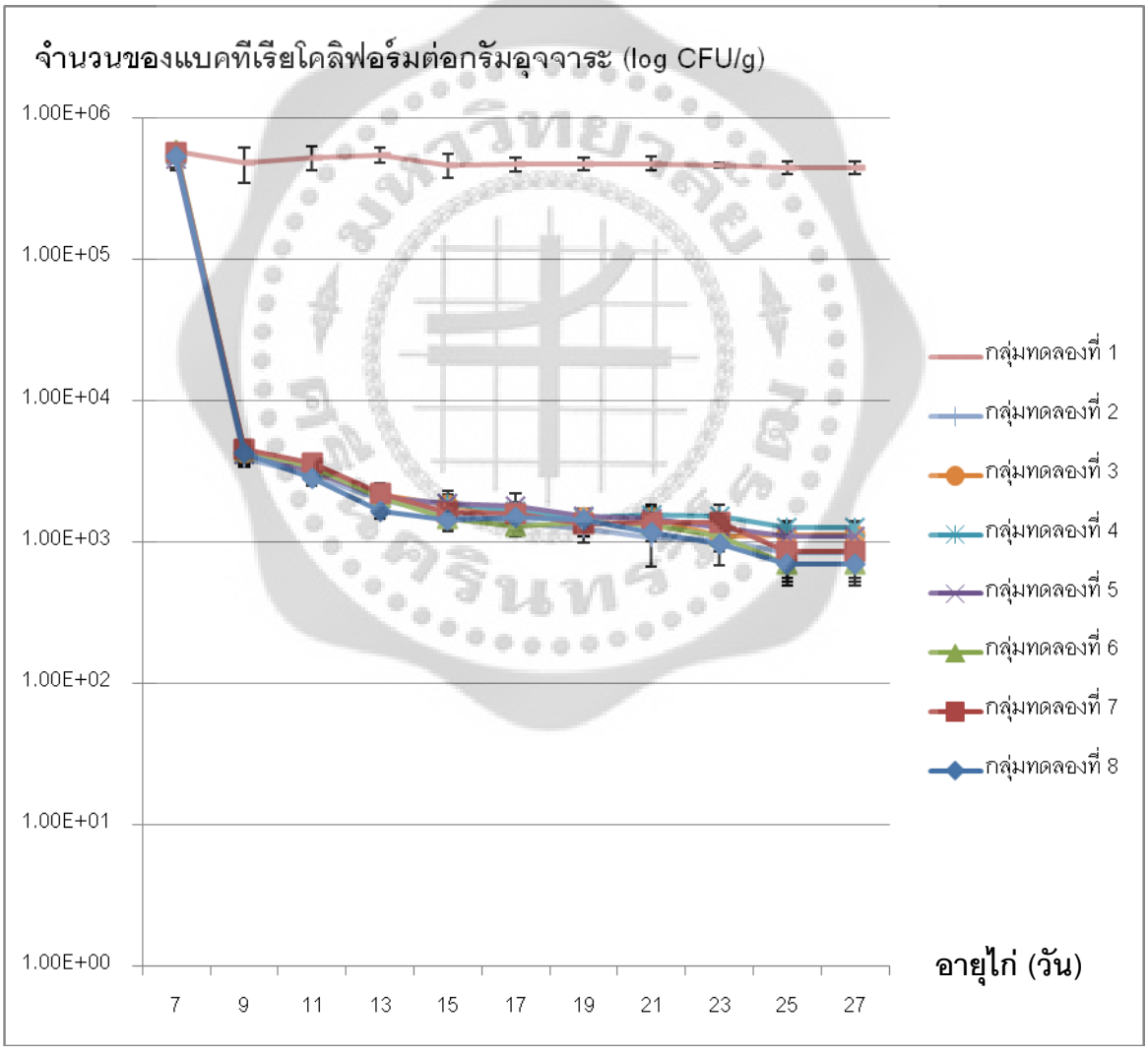
เมื่อทำการนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกโดยทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระของไก่ทุก 2 วัน ทำการ spread บนอาหาร MRS agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ร้อยละ 0.5 นับจำนวนโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) เกิดขึ้น พบว่า ทุกกลุ่มทดลองมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มขึ้นจากกลุ่มทดลองที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) ดังแสดงในภาพประกอบ 14



ภาพประกอบ 14 แสดงจำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อกรัมอุจจาระ

8.4 จำนวนของแบคทีเรียโคลิฟอร์ม

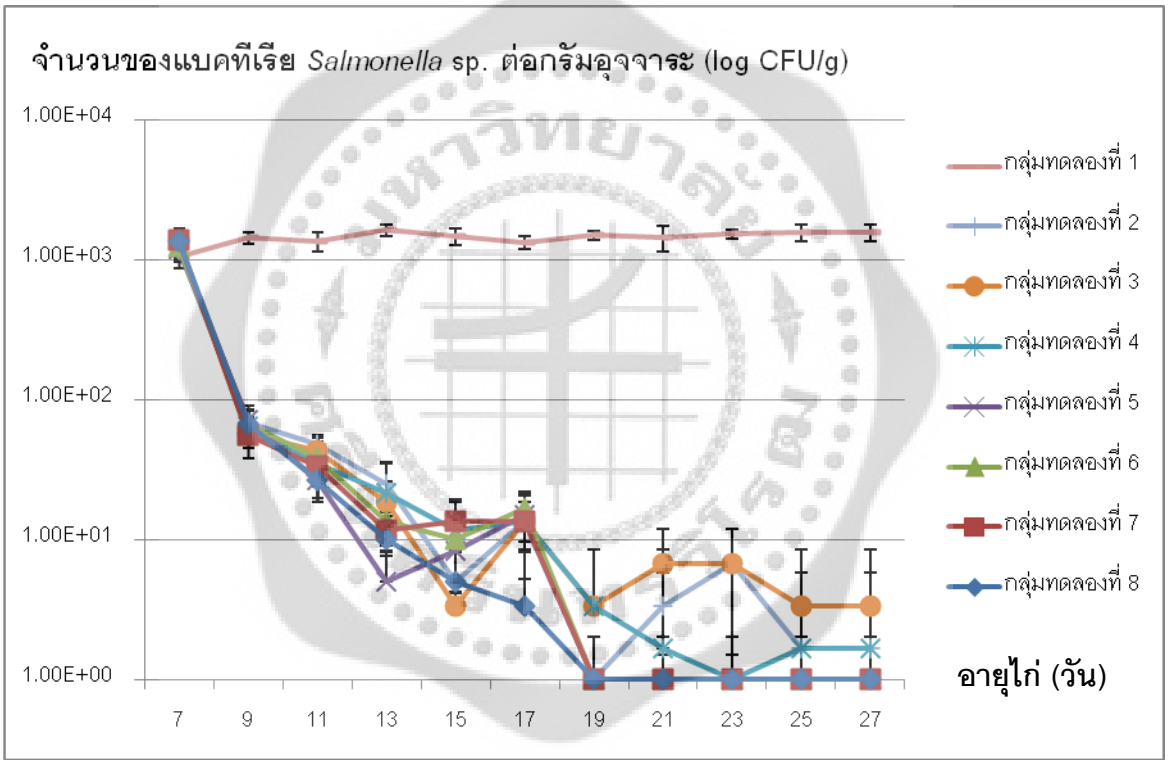
เมื่อทำการนับจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มโดยทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระของไก่ทุก 2 วัน ทำการ spread บนอาหาร EMB agar นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น พบว่า ทุกกลุ่มทดลองมีจำนวนแบคทีเรีย โคลิฟอร์มลดลงแตกต่าง จากกลุ่มทดลองที่ 1 หรือกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) โดยจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มนั้นจะ เริ่มลดลงในครั้งที่ 2 ของการเก็บตัวอย่าง ซึ่งไก่ได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติกมาแล้วเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นค่อยๆ ลดลงตลอดการทดลอง แต่กลุ่มทดลองที่ 1 หรือ กลุ่มควบคุม จะมี จำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มสูงตลอดการทดลอง ใน ดังแสดงใน ภาพประกอบ 15



ภาพประกอบ 15 แสดงจำนวนของแบคทีเรียโคลิฟอร์มต่อกรัมอุจจาระ

8.5 **จำนวนของแบคทีเรีย *Salmonella* sp.**

เมื่อทำการนับจำนวนแบคทีเรีย *Salmonella* sp. โดยทำการเก็บตัวอย่างอุจจาระของไก่ทุก 2 วันทำการ spread บนอาหาร SS agar นับจำนวนโคโลนี ที่มีสีดำ ซึ่งคาดว่าจะ เป็น *Salmonella* sp. พบว่าทุกกลุ่มทดลองมีจำนวนแบคทีเรีย *Salmonella* sp. ลดลง ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มทดลองที่ 1 หรือกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P< 0.05) โดยจำนวนแบคทีเรีย *Salmonella* sp. นั้นจะลดลงในวันที่ 3 ของการทดลองโดยไก่มีอายุ 10 วัน และลดลงตลอดการทดลอง แต่กลุ่มทดลองที่ 1 หรือกลุ่มควบคุมจะตรวจพบ จำนวนแบคทีเรีย *Salmonella* sp. ตลอดการทดลอง ในดังแสดงในภาพประกอบ 16



ภาพประกอบ 16 แสดงจำนวนของแบคทีเรีย *Salmonella* sp. ต่อกรัมอุจจาระ

จากผลการทดลองภาคสนาม การชั่งน้ำหนัก ของไก่ และนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่ากลุ่มทดลองที่ 2, 3, 4, 6, 7 และ 8 เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมโดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P> 0.05) แต่ในกลุ่มทดลองที่ 5 มีน้ำหนักลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุม โดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P> 0.05) จึงได้ข้อสรุปว่าการให้โปรไบโอติกไม่มีผลต่อการเจริญของไก่ตลอดทั้ง 28 วันของการเลี้ยง จากการวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียโคลิฟอร์มนั้น พบว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ มีการให้อาหารที่

ผสมโปรไบโอติก จะมีปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในอุจ จาระน้อยกว่า ในกลุ่มทดลองอื่น และปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มของกลุ่มควบคุมจะมีปริมาณมากกว่ากลุ่มทดลอง ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก โดยเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์ม จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบบริเวณลำไส้เล็กของไก่ในระยะเริ่มแรก (ลูกไก่) และลดลงเล็กน้อยเมื่อไก่มีอายุมากขึ้น แต่การให้อาหารให้อาหารเสริมโปรไบโอติกจะไม่พบเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มเลยจึงส่งผลดีต่อสุขภาพของไก่ จากการศึกษาปริมาณเชื้อ *Salmonella* sp. พบว่า เชื้อ *Salmonella* sp. ลดลงหลังจากให้อาหารไก่เสริมโปรไบโอติกในวัน ที่ 3 ของการทดลองโดยไก่มีอายุ 10 วัน การลดลงของเชื้อ *Salmonella* sp. อาจเกิดจากความสามารถในการสร้างสภาวะกรดอ่อนๆ ได้แก่ กรดแลคติก หรือ อาจสร้างสารยับยั้ง ได้แก่ แบคทีริโอซิน หรือรูเทอริน ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค หรืออีกปัจจัยหนึ่งอาจมีการขัดขวางการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคบริเวณรีเซฟเตอร์ ที่ผิวเซลล์ลำไส้ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะเจริญที่ ผนังลำไส้ แล้วเพิ่มจำนวนและยึดครองบริเวณรีเซฟเตอร์ดังกล่าวทำให้เชื้อก่อโรคถูกกำจัดออกไปจากระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ ใช้โปรไบโอติกสายพันธุ์ผสม จะช่วยเพิ่มโอกาสในการยึดเกาะกับระบบทางเดินอาหารมากกว่าโปรไบโอติกสายพันธุ์เดี่ยว (Tannis. 2008: 32) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการใช้โปรไบโอติกสามารถลดแบคทีเรียโคลิฟอร์มและเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* sp. ในทางเดินอาหารของไก่ได้

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

แบคทีเรีย กรดแลคติก ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก ทั้งในรูปแบบ แบคทีเรียแบบสายพันธุ์เดี่ยวหรือแบคทีเรียสายพันธุ์ผสม จะต้องทนต่อสภาพแวดล้อมภายในระบบทางเดินอาหารได้ดี ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ดังนั้น ในการคัดเลือก เชื้อจึงจะต้องศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้น ได้แก่ ความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี (Kontula; et al. 1998. 246-252) ทนต่อ pH ต่ำ (Morgensen; et al. 2002: 10-18) นอกจากนี้จะต้องศึกษาคุณสมบัติในด้านการเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ (functional properties) ได้แก่ การผลิตสารยับ ยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค การลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในทางเดินอาหารของสัตว์ และจะต้องมีความสามารถในการเกาะติดลำไส้ได้ดี

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจาก อุจจาระจากสัตว์ ได้แก่ วัว หมู ไก่ และเป็ด ในฟาร์มต่างๆ จำนวน 150 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียก รดแลคติกได้ทั้งหมด 81 ไอโซเลต จากนั้นนำ มาทำการย้อมสีแกรม เพื่อดูลักษณะรูปร่าง เก็บเชื้อที่ติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์ และนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์ คะตะเลส (Axelsson. 1998: 1-72) จากการทดลองพบว่าทั้ง 81 ไอโซเลตติดสีแกรมบวก และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส จากนั้นมาทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย โดย วิธี agar spot test (Schillinger; & Lücke. 1989: 1901-1906) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli, Salmonella* sp., *S. aureus, Shigella* sp. และ *Klebsiella* sp. เพื่อยืนยันความสาม ารถในการสร้างสารยับยั้ง พบว่ามีเชื้อ 61 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* มีเชื้อ 43 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง เชื้อ *Salmonella* sp. มีเชื้อ 59 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มีเชื้อ 78 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง เชื้อ *Shigella* sp. และมีเชื้อ 79 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Klebsiella* sp. โดยส่วนใหญ่การสร้างการยับยั้งจุลินทรีย์มักเกิดจากกรดอินทรีย์ที่เชื้อสร้างขึ้นโดยพบว่ามีรายงานถึงการยับยั้งในจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด เช่น เชื้อ *Salmonella* ได้แก่ *S.* Typhimurium (Fuller. 1989: 365-378), *S. enteritidis* 935/37, *S. pullorum, S. blokley* และ *S. enteritidis* 9/448 (Jin; et al. 1996: 67-71) เชื้อ *E. coli* ได้แก่ *E. coli* สายพันธุ์ 0157:H7, 01:K1, 02:K1 และ 078:K80 (Garriga; et al. 1998: 125-132); (Jin; et al. 1996: 67-71) และเชื้อ *S. aureus* (Fuller. 1989: 365-378) นอกจากนี้ฟรานซ์และคนอื่นๆ (Franz; et al. 1998: 231-235)

พบว่า *Lb. plantarum* BFE905 สามารถแบคทีริโอซินที่เรียกว่า plantaricin D ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งต่อ *Listeria monocytogens* ได้ด้วย

จากการ นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ทั้ง 81 ไอโซเลต มาศึกษา การเจริ ญในสภาวะที่ไม่เหมาะสม โดย การตรวจสอบการเจริญในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีสูง และการตรวจสอบ การเจริญในสภาวะ pH ต่ำ (Guo; et al. 2010: 321-326) พบว่าทั้ง 81 ไอโซเลตสามารถ เจริญในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีสูง 0.3% และ 1.0% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และสามารถ เจริญในสภาวะ pH ต่ำที่ 3.5 และ 4 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของจีน และคนอื่นๆ (Jin; et al. 1996: 67-71) รายงานว่า เชื้อ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากลำไส้ไก่ ได้แก่ *Lb. acidophilus* I16, *Lb. acidophilus* I26, *Lb. fermentum* I25 และ *Lb. brevis* I23 สามารถทนต่อกรดที่มีค่า pH ของน้ำย่อยเท่ากับ 0.5-2.0 ได้ เมื่อนำมาทดสอบในสภาวะความเป็นกรดที่ pH 0.5, 1, 2, 3, 4 และ 5 พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีชีวิตรอดได้ ที่ pH 0.5-2.0 และเจริญได้เมื่อปรับค่า pH ให้สูงขึ้นเป็น pH 3-5 นอกจากนี้การทนต่อความเป็นกรดใน กระเพาะอาหา รแล้ว การทนต่อเกลือน้ำดี ยังมีผลทำให้เชื้อ *Lactobacillus* มีชีวิตและเจริญในระบบ ทางเดินอาหารได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเป็นบริเวณลำไส้ส่วนต้น ซึ่งจากการทดสอบ การเจริญของ เชื้อ *Lactobacillus* ในอาหาร MRS ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ระดับความ เข้มข้ นนี้มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และสรุปว่า เชื้อ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากลำไส้ไก่มี คุณสมบัติทนต่อกรดและเกลือน้ำดี เมื่อเคลื่อนที่ผ่านส่วน กระเพาะพัก (crop) กระเพาะจริง (gizzard) และลำไส้เล็กของไ ก่ จึงสามารถมีชีวิตอยู่รอดในระบบ ทางเดินอาหารไก่ได้ เนื่องจากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นโ ปรไบโอติ กจะถูกนำมาผสมกับอาหาร เมื่อ กินเข้าไป อาหารจะเคลื่อ นที่ไปยังกระเพาะอาหาร ซึ่งมีน้ำย่อยหลั่งออกมาช่ วยในการย่อยอาหารและ ทำให้ค่า pH ในกระเพาะอาหาร ก่อนรับประทานอา หารมีค่าลดลงประมาณ 2.0-2.5 จากนั้นอาหารจะ อยู่ภายในกระเพาะอาหารประมาณ 2-4 ชั่วโมง (Yin; & Zheng. 2005: 67-68) หลังจากนั้นอาหารจะ เคลื่อนที่ไปยังลำไส้เล็ก ซึ่งมีน้ำดีเป็นองค์ประกอบ โดยน้ำดีนอกจากจะถู กปลดปล่อยออกมาจาก ถุงน้ำดีเพื่อช่วยในการย่อ ยอาหารชนิดไข มันและดูดซึ มวิตามินที่ไม่ละลายน้ำ แล้วน้ำดียังเป็นอันตราย ต่อผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ในลำไส้ด้วย ดังนั้นความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี จึงเป็นอีกหนึ่ง คุณสมบัติในการคัดเลือกความเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติก (Yu; & Tsen. 1993: 75)

จากการนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้มาศึกษาความมีขั้ว–ไม่มีขั้ว เพื่อดูคุณสมบัติการเกาะติดลำไส้ซึ่ง การเกาะติดของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยอาศัยคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำ และนำมาคำนวณ Percent Hydrophobicity Index (HPBI) (Rosenberg; et al. 1980: 29-33) พบว่า 12 ไอโซเลตสามารถเกาะติดลำไส้ได้ดี มาก มีเชื้อ 2 ไอโซเลตสามารถเกาะติดลำไส้ได้ดี และ 67 ไอโซเลตสามารถเกาะติดลำไส้ได้น้อย ซึ่งได้มีรายงานเกี่ยวกับการ เกาะติดลำไส้ได้ดีจากการศึกษาของโคลาโด เมอริรูท์โอ และแซลมิเนน (Collado; Meriluoto; & Salminen. 2008: 1065-1073) รายงานว่า การจับกันเองเป็นคุณสมบัติของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ต้องการ เนื่องจากการเกาะติดของเซลล์จุลินทรีย์มีความสำคัญต่อการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร โดยการจับกันเองระหว่างจุลินทรีย์โปรไบโอติกและเชื้อก่อโรคจะช่วยกำจัดเชื้อก่อโรคออกจากระบบทางเดินอาหาร โดยเข้าแทนที่และปรับสมดุ ลเชื้อในระบบลำไส้ ปัจจัยที่มีผลต่อการจับกันเองของจุลินทรีย์โปรไบโอติกกับเชื้อก่อโรค ได้แก่ ความจำเพาะของสายพันธุ์ เวลาและสภาวะในการบ่มเชื้อ เนื่องจากความสามารถในการเกาะกลุ่มกันเองเป็นคุณสมบัติที่สำคัญอีกประการหนึ่ง และพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับพื้นผิวเ ซลล์ที่ไม่ชอบน้ำ ดังนั้นการทดสอบการเกาะกลุ่มกันเองและการท ดสอบการเกาะติดด้วยการทดสอบสารไฮโดรคาร์บอน (bacterial adhesion to hydrocarbons; BATH test) ที่แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติของพื้นผิวเซลล์ที่แตกต่างของจุลินทรีย์โปรไบโอติก เช่นเดียวกับการรายงานขอ งเวิดสตรอม และคนอื่นๆ (Wadstrom; et al. 1987: 513-520) ได้ศึกษาพบ *Lactobacillus* จำนวนมากจากลำไส้หมู โดย lactobacilli เหล่านี้มีแคปซูลที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบและมีสภาพ hydrophobicity สูง แคปซูลดังกล่าวมีความสำคัญต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของ lactobacilli ในลำไส้หมู นอกจากนี้ เฮนริกส์ซันและคนอื่นๆ (Henriksson; et al. 1991: 101-106) ได้ทดลองให้เห็นว่าโปรตีนที่อยู่บนผิวของแบคทีเรียเป็นปัจจัยหลักในการจับยึดของ *Lb. fermentum* บนเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะอาหารหมู อย่างจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์ โฮสต์ และจากการศึกษาของกัสโซลส์ จอนซาเลส และโอลิเวอร์ (Gusils; González; & Oliver. 1999: 981-987) ได้ศึกษาความสามารถในการยึดเกาะของ *Lactobacillus* 3 สายพันธุ์ ซึ่งแยกจากทางเดินอาหารไก่ที่มีสุขภาพดี พบว่า *Lb. animalis* สามารถยึดเกาะที่เซลล์เยื่อบุได้ดีที่สุด โดยอาศัย สารโครงสร้างคล้าย lectin อันประกอบด้วย กลูโคสและแมนโนส ซึ่งเป็นน้ำตาลที่จำ เพาะในการยึดจับ จากผลที่ได้นี้ เป็นก ารยืนยันว่าคาร์โบไฮเดรตมีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิสัมพันธ์ระหว่าง adhesion ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก กับเยื่อบุผิวของโฮสต์ นอกจากนี้ยังพบว่า

เชื้อ *Lb. fermentum* มีประสิทธิภาพช่วยลดการจับยึด เกาะของ *S. pullorum* ได้ร้อยละ 77 ในขณะที่ *Lb. animalis* สามารถยับยั้งการยึดเกาะของ เชื้อ *S. pullorum*, *S. enteritidis* และ *S. gallinarum* ได้ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 90, 88 และ 78 ตามลำดับ ดังนั้นกล่าวได้ว่า lactobacilli ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถขัดขวาง การจับยึดของ *Salmonella* ได้ โดยการยึดเกาะของ lactobacilli ที่ ผิวเนื้อเยื่อต้อง อาศัยรีเซฟตอร์ในที่นี้ คือ ไฟโบรเนคตินบนเยื่อบุผิว เช่นเดียวกับการศึกษาของ บล์อมเบิร์ก เฮนเรกส์สัน และคอนเวย์ (Blomberg; Henriksson; & Conway. 1993: 34-39) พบว่า *Lb. plantarum* 104R ที่แยกได้จากกระเพาะหมู สามารถยับยั้งการยึดเกาะของ *E. coli* K88 บนเยื่อเมือกลำไส้เล็กส่วน ileum ของลูกหมูได้คิดเป็นร้อยละ 50 โดยการผลิตสารประกอบโปรตีน ซึ่ง สารประกอบโป รตีนจ ะไป จับกับองค์ประกอบเยื่อเมือก จึงขัดขวางการเข้าจับโดย *E. coli* K88ab และ *E. coli* K88ac ได้ และจากการศึกษาของ จินและคนอื่นๆ (Jin; et al. 1996: 67-71) ได้ตรวจสอบความสามารถขอ ง *Lactobacillus* ที่แยกจากทางเดินอาหารไก่ ในการยึดเกาะที่เซลล์เยื่อบุของลำไส้เล็กส่วน ileum จาก ทั้งหมด 26 สายพันธุ์ พบว่า *Lb. acidophilus* I26 เพียงสายพันธุ์เดียวที่มีความสามารถในการยึดเกาะ ได้ดีที่สุดและจากการศึกษาผลของอุณหภูมิ และค่า pH ต่อการยึดเกาะของแบคทีเรีย ปรากฏว่าทั้ง 2 ปัจจัยไม่มีผลต่อความสามารถในการยึดเกาะที่เซลล์เยื่อบุส่วนนี้ของไก่ นอกจากนี้ *Lactobacillus* ที่ แยกได้จากส่วนของลำไส้ต่างกัน (ได้แก่ ileum, jejunum และ caecum) มีความสามารถในการ ยึดเกาะที่เยื่อบุผิวเซลล์ ต่างกันด้วย เนื่องจากแบคทีเรียมีความจำเพาะต่อตำแหน่งของลำไส้ นอกจากนี้โคสและคนอื่นๆ (Kos; et al. 2003: 981- 987) ได้มีการศึกษาความสามารถในการ เกาะกลุ่มกันเองและคุณสมบัติในการเกาะติดของเชื้อ *Lb. acidophilus* M92 ต่อเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ สุกร ผลการทดลองสนับสนุนว่า ความสามารถในการเกาะติดของเชื้อบนเยื่อเมือกและเซลล์เยื่อบุผิว เกิดจากกระบวนการที่ต่อเนื่องและก่อให้เกิดการสัมผัสกันของเยื่อหุ้มเซลล์แ บคทีเรียและเกิดการ จับกันได้เอง ซึ่งการทดสอบนี้ สามารถนำมาใช้เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นจุลิ นทรีย์ โปรไบโอติกเบื้องต้นได้

จากการนำเชื้อที่แสดงความสามารถในการเกาะติดลำไส้ได้ดีมาก ทั้ง 12 ไอโซเลตมาทำการ จัดจำแนกโดยศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA และจำแนกสปีชีส์โดยเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าไอโซเลต K16 (1,472 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. reuteri* (GenBank accession number: KC700337) ร้อยละ 99 ไอโซเลต P6 (1,531 คู่เบส)

มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. plantarum* (GenBank accession number: KC700341) ร้อยละ 100 ไอโซเลต P8 (1,485 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. reuteri* (GenBank accession number: KC700338) ร้อยละ 100 ไอโซเลต P25 (1,520 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. paraplantarum* (GenBank accession number: KC700340) ร้อยละ 100 ไอโซเลต P30 (1,445 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. reuteri* (GenBank accession number: KC700339) ร้อยละ 100 และไอโซเลต P31 (1,529 คู่เบส) มีความคล้ายคลึงกับ *Lb. plantarum* (GenBank accession number: KC700342) ร้อยละ 100 จึงได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lb. plantarum* P6, *Lb. paraplantarum* P25 และ *Lb. reuteri* P30 ซึ่งต่างสปีชีส์กันและมีความโดดเด่นในคุณสมบัติต่างๆ ทั้ง ความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี (Kontula; et al. 1998. 246-252) ทนต่อ pH ต่ำ (Morgensen; et al. 2002: 10-18) มีคุณสมบัติในด้านการเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ (functional properties) ได้แก่ การผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค และความสามารถในการเกาะติดลำไส้ได้ดี มาทำการทดสอบการอยู่ร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (Daeschel. 1992: 57- 80) โดยนำเชื้อ *Lb. plantarum* P6, *Lb. paraplantarum* P25 และ *Lb. reuteri* P30 มาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ในแนวตั้งแล้วขีดอีกครั้งในแนวที่ตั้งฉากกัน พบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถอยู่ร่วมกันได้โดยไม่มีการยับยั้งกันเอง จึงนำจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์มาทำการศึกษาความสามารถในการเกาะติดลำไส้โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง (Chung-Yi Wang. et al. 2010: 578-585) โดยใช้จุลินทรีย์ทั้งสายพันธุ์เดี่ยวและสายพันธุ์ผสม ทำการเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่แบคทีเรียกรดแลคติก และกลุ่ม negative control ที่ใส่เชื้อ *B. megaterium* จากการทดลอง พบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสายพันธุ์เดี่ยวและสายพันธุ์ผสมสามารถเกาะติดลำไส้ได้ดีมาก สอดคล้องกับการทดลองของ ค็อคออนเนียร์และคนอื่นๆ (Coconnier; et al. 1992: 2034-2039) รายงานว่า *Lb. acidophilus* BG2F04 สามารถยึดเกาะเซลล์ Caco-2 ได้ โดยมีกลไกขั้นแรกเกี่ยวข้องกับโปรตีนที่แบคทีเรียปล่อยออกมาภายในส่วนของเหลวของเซลล์เพาะเลี้ยง และขั้นตอนที่สองจะเกี่ยวกับโมเลกุลของโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่ผิวเซลล์แบคทีเรีย นอกจากนี้โชวเวียร์และคนอื่นๆ (Chauviere; et al. 1992: 1689-1699) ยังพบว่า *Lb. acidophilus* LB สามารถยึดเกาะเซลล์ Caco-2 และสามารถยับยั้งการยึดเกาะของ *E. coli* ที่เซลล์ Caco-2 ได้ด้วย

ในการใช้โปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมนั้นมีข้อดีกว่าการใช้โปรไบโอติกสายพันธุ์เดี่ ยว เนื่องจากการใช้โปรไบโอติกหลา ยสายพันธุ์ จะช่ว ยในการเสริมฤทธิ์ กัน โดยสปีชีส์ที่ต่างกันจะมีประโยชน์ต่อสุขภาพแตกต่างกัน เช่น *Lb. acidophilus* และ *Lb. reuteri* ออกฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียเช่นเดียวกันซึ่งจะช่วยลดเชื้อก่อโรคในลำไส้ อย่างไรก็ตาม *Lb. acidophilus* จะให้ประโยชน์แก่สุขภาพในด้านอื่น ๆ อีกด้วย ได้แก่ ความสามารถในการสร้า งวิตามินเค และแลคเตส (lactase) เป็นต้น ในขณะเดียวกัน *Lb. reuteri* สามารถสร้างสาร รูเทอริน (reuterin) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการรักษาการติดเชื้อจาก rotavirus และ *H. pylori* ดังนั้น การใช้โปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมจะช่ว ยเพิ่มประโยชน์ต่อสุขภาพ และยังช่วยเพิ่มโอกาสในการยึดเกาะกับระบบทางเดินอาหารมากกว่าโปรไบโอติกสายพันธุ์เดี่ยว นอกจากนี้โปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมยังแสดงถึงประสิทธิภาพการเป็นโปรไบโอติกที่หลากหลาย ซึ่งบางคุณสมบัตินั้นจำเพาะต่อสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งเท่านั้น (strain specific) (Tannis. 2008: 32)

จากการ ผสมเซลล์แบคทีเรีย กรดแลคติก ในอาหารไก่ เนื้อและ ทำการ ตรวจนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก ที่มีชีวิตในอาหารไก่เนื้อ พบว่า ปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกลดลงตลอดการทดลอง โดยในวันที่ 6 จะพบว่าปริมาณเซลล์ที่ตรวจพบต่ำกว่า ปริมาณเซลล์เริ่มต้นประมาณ 1- 2 log cycle แต่ในวันที่ 3 พบว่าเซลล์ยังสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ถึง 10^7 CFU/g ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกนำไปใช้ในระยะเวลาไม่เกิน 3 วัน เนื่องจากยังมีปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการป้อนให้ไก่และจำนวนเซลล์ที่อยู่รอดในลำไส้ไก่ต้องมีร ะดับที่สูง (10^7 CFU/g) กล่าวคือ ยังคงเป็นปริมาณที่ยอมรับในการนำไปใช้เป็นโปรไบโอติก และต้องทำการ เก็บรักษาอาหารไก่เนื้อไว้ในตู้เย็น เพื่อรักษาความมีชีวิตของเชื้อสด (รุจา มาลัยพวง . 2544: 98) สอดคล้องกับ ฐิติพงษ์ ธนะรัชติการนนท์ (2539) พบว่าปริมาณเซลล์สดของ *Lactobacillus* spp. ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนัก/ปริมาตร) 10^6 CFU/ml ให้ทุก 3 วัน เป็นปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับป้อนให้ไก่ เนื่องจากให้จำนวนเซลล์ที่อยู่รอดในลำไส้ไก่อยู่ในระดับที่สูงพอสมควร (10^7 CFU/g ที่ 19 วันของการเลี้ยง)

จากนั้นนำอาหารที่ผส มโปรไบโอติกมาทำ การทดลองภาคสนาม โดย นำอาหารผสมโปรไบโอติกให้ไก่กิน โดย ใช้ไก่เนื้อพันธุ์ Ross308 อายุ 7 วัน วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 8 กลุ่ม แต่ละกลุ่มมีไก่ 6 ตัว รวมไก่ที่ใช้ทั้งสิ้น 48 ตัว ทำการทดลองเป็นเวลานาน 21 วัน ทำการเก็บข้อมูลเจริญเติบโต โดยการชั่งน้ำหนักของไก่ทั้งหมดในช่วงเริ่มต้นการทดลอง (อายุของไก่เมื่อเริ่มต้นการทดลอง คือ 7 วัน) และติดตามการเจริญ

จากน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นโดยชั่งทุก 3 วันของการทดลอง จนครบ 21 วัน (อายุของไก่ในวันสุดท้ายของ การทดลอง คือ 28 วัน) พบว่า น้ำหนักไก่ในกลุ่มทดลองที่ 2, 3, 4, 6, 7 และ 8 เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมโดย ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P> 0.05) แต่ในกลุ่มทดลองที่ 5 มีน้ำหนักลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุม โดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P> 0.05) อาจเป็นเพราะใช้ระยะเวลาในการทดลองสั้นเกินไป คือ 21 วัน (ไก่อายุ 28 วันหลังสิ้นสุดการทดลอง) โดยอาจจะต้องใช้ระยะเวลาเพิ่มขึ้นเพื่อให้ไก่ได้มีระยะเวลา ในการเจริญ เติบโต หลังจากได้รับอาหารเสริมโปรไบโอติก เช่นจากตัวอย่างงานวิจัยของฐิติพงษ์ ธนะรัชติการนนท์ (2539) ศึกษาการเสริม *Lactobacillus* spp. ให้ไก่ทุก 3 วันและมีการเว้นช่วง ระยะเวลาการให้ที่พอเหมาะสามารถนำไปใช้จริงในงานภาคสนาม ซึ่งส่งผลสอดคล้องกับการศึกษา ของเมอร์รี่ ฮินตันและเบท (Murry; Hinton; & Buh. 2006: 344-350) รายงานถึงผลกระทบของการ เลี้ยงไก่เนื้อ (อายุ 1-42 วัน) ด้วย Botanical probiotic ซึ่งมีส่วนประกอบของ *Lactobacillus* ต่อ สมรรถภาพการเจริญเติบโตและปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ในไส้ติ่ง ทวาร และน้ำล้างจากซากของไก่เนื้อ ปรากฏว่าค่าเฉลี่ยน้ำหนักมีค่าเพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างกัน ทางสถิติ (P> 0.05) แต่ปรากฏว่าปริมาณการ กินอาหารและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อในช่วงอายุ 22 ถึง 42 วัน ต่ำลงในไก่เนื้อที่ได้รับ Botanical probiotic 0.10 เปอร์เซ็นต์นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณ *Lactobacillus* ในทวารมีปริมาณ สูงกว่า *Clostridium perfringens* และพบว่าปริมาณ *Clostridium perfringens* ในทวารมีปริมาณต่ำ กว่ากลุ่มควบคุม

จากการวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียโคลิฟอร์มนั้น พบว่ากลุ่มควบคุมที่ ไม่มีการให้อาหารที่ผสมโปรไบโอติกจะมีปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในอุจจาระน้อยกว่าใน กลุ่มทดลองอื่น และปริมาณเชื้อโคลิฟอร์มของกลุ่มควบคุมจะมีปริมาณมากกว่ากลุ่มทดลองที่ได้รับ อาหารผสมโปรไบโอติก โดยเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มจัดเป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบบริเวณลำไส้ เล็กของไก่ในระยะเริ่มแรก (ลูกไก่) และลดลงเล็กน้อยเมื่อไก่มีอายุมากขึ้น อย่างไรก็ตามไก่อาจได้รับ แบคทีเรียโคลิฟอร์มกลุ่มที่ก่อโรคจากอาหารที่ได้รับเข้าไป ดังนั้น การให้อาหารเสริม โปรไบโอติกจะ ไม่พบเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์ม จึงส่งผลดี ในด้าน สุขภาพของไก่ สอดคล้องกับ การศึกษา ของวัตกิ้น มิวเลอร์และแนล (Watkins; Miller; & Nell. 1982: 1298-1308) พบว่าการใช้เชื้อ *Lb. acidophilus* เพื่อป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจาก *E. coli* ในลูกไก่ การทดลองเพื่อป้องกันโรคทำการ ศึกษาโดยการ กรอกเชื้อ *Lb. acidophilus* ให้กับลูกไก่อายุประมาณ 2 วันก่อน ต่อมาอีก 2 วัน จะให้เชื้อ *E. coli*

สายพันธุ์ที่ก่อโรคในไก่ ผลที่ได้คือ *Lb. acidophilus* ที่ให้ไก่ในช่วงแรก สามารถช่วยลดอัตราการตายของลูกไก่ได้ ส่วนในการทดลองเพื่อรักษาโรคที่เกิดจาก *E. coli* จะทำโดยการกรอกเชื้อ *E. coli* ก่อนประมาณ 10^8-10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้กับลูกไก่อายุ 2 วัน หลังจากนั้นอีก 2 วัน จึงกรอกเชื้อ *Lb. acidophilus* ประมาณ 10^8-10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลที่ได้คือ การให้เชื้อ *Lb. acidophilus* มีผลช่วยลดอัตราการตายของลูกไก่ได้ โดยการให้ *Lb. acidophilus* ไม่ว่าจะให้ก่อนหรือหลังจากได้รับ *E. coli* จะมีผลทำให้ pH ในกระเพาะพัก ลำไส้ใหญ่ และไส้ตรงลดลง นอกจากนี้จากการศึกษาของ งจินและคนอื่นๆ (Jin; et al. 1998: 197-209) ยังพบว่า เมื่อให้อาหารที่ผสมด้ วย *Lactobacillus* แก่ไก่กระทง จะสามารถลดปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม โคลิฟอร์มในกระพุ้งลำไส้ส่วนต้นได้ และพบ lactobacilli สูงกว่ากลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับเอนโด และคนอื่นๆ (Endo; et al. 1999: 1569-1575) ซึ่งใช้เชื้อผสมของโปรไบโอติกกับเชื้อก่อโรค (*Bacillus, Lactobacillus, Streptococcus, Clostridium, Candida* และ *Saccharomyces*) แก่ไก่ตัวผู้ พบว่า สามารถช่วยลดจำนวน เชื้อในแฟมิลี่ Entero-bacteriaceae ในกระพุ้งลำไส้ใหญ่ได้อย่างมาก โดย *Bacillus, Streptococcus, Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* จะมีจำนวนเพิ่มขึ้น ในขณ ะที่ ยีสต์ จะ มีจำนวนลดลง ดังนั้น อาจกล่าวได้ว่าโปรไบโอติกช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของไก่ นอกจากนี้ไมล์ส และคนอื่นๆ (Miles; et al. 1981: 693-704) ได้นำ *Lb. acidophilus* ทดลองเสริมในอาหารไก่ไข่ ในพื้นที่ที่ต่างกัน 3 แห่ง คือ ที่รัฐอริโซน า ฟลอริด้า และเซาท์ดาโกต้า พบว่าให้ผลแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ และ พบว่าที่รัฐฟลอริด้าการเพิ่มขึ้นของ *Lb. acidophilus* อย่างรวดเร็ว มีผลทำให้จำนวน *E.coli* ในระบบทางเดินอาหารลดลงอย่างเห็นได้ชัด

จากการศึกษาปริมาณเชื้อ *Salmonella* sp. ในอุจจาระไก่ พบว่าเชื้อ *Salmonella* sp. ลดลงหลังจากให้อาหารไก่เสริมโปรไบโอติกในวัน ที่ 3 ของการทดลองโดยไก่มีอายุ 10 วัน การลดลงของเชื้อ *Salmonella* sp. อาจเกิดจากความสามารถในการสร้างสภาวะกรด อินทรีย์อ่อนๆ ได้แก่ กรดแลคติก หรืออาจสร้างสารยับยั้ง ได้แก่ แบคทีริโอซิน หรือ รูเทอริน ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค หรืออีกปัจจัยหนึ่งอาจมีการขัดขวางการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคบริเวณรีเซฟเตอร์ที่ผิวเซลล์ลำไส้ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะเจริญที่ ผนังลำไส้ แล้วเพิ่มจำนวนและยึดครองบริเวณรีเซฟเตอร์ดังกล่าว ทำให้เชื้อก่อโรคถูกกำจั ดออกไปจากระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ การใช้โปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมจะช่วยเพิ่มโอกาสในการยึดเกาะกับระบบทางเดินอาหาร ได้มากกว่าการใช้โปรไบโอติกสายพันธุ์เดี่ยว

(Tannis. 2008: 32) เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกในแต่ละส ายพันธุ์จะอาศัยความจำเพาะของผิว เซลล์แบคทีเรียกับเซ ลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร ที่ต่างกันด้วย (Henriksson; et al. 1991: 101-106) จึง สามารถที่จะเพิ่มโอกาสในการยึดเกาะได้มากขึ้น ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าการใช้โปรไบโอติกสามารถ ลดแบคทีเรียโคลิฟอร์มและเชื้อแบคทีเรีย *Salmonella* sp. ในทางเดินอาหารของไก่ได้ โดยมีรายงาน จากบราวแนล แซดเลอร์และฟาแนลเลอร์ (Brownell; Sadler; & Fanelli. 1969: 804-816) ทำการ ศึกษาการติด เชื้อ *Salmonella* พบว่า เชื้อดังกล่าว มักจะอาศัยอยู่ในลำไส้ไก่ โดยไม่แสดงอาการ ซึ่ง ลูกไก่จะมีความไวที่สุดที่จะได้รับเชื้อ โดยเชื้อจะเจริญได้ดีในทางเดินอาหารของลู กไก่ แล้วเพิ่มจำนวน อย่างรวดเร็ว พบมากในส่วนของไส้ติ่ง

ในการศึกษาเชื้อแบคทีเรียโคลิฟอร์มและแบคทีเรีย *Salmonella* sp. นี้อาจต้องทำศึกษา เพิ่มเติมเพื่อให้เห็น ผลที่ชัดเจน ถึงการป้องกันและการรักษาโรคได้ดี โดยการศึกษาการป้องกันนั้น อาจทำการออกแบบการทดลองโดยอ าหารที่เสริมด้วยโปรไบโอติกก่อน จากนั้นทำการให้เชื้อ *Salmonella* sp. เพื่อสังเกตอาการของโรคที่เกิดขึ้นและอัตราการตายของไก่ สำหรับการทดลองเพื่อ รักษาโรคนั้นอาจให้เชื้อ *Salmonella* sp. ก่อนแล้วจึงให้อาหารเสริมโปรไบโอติก ตัวอย่างเช่นออดิซิโอ โอลิเวอร์และเอเฟลาร์ (Audisio; Oliver; & Apella. 2000: 1333-1337) ที่ได้ทำการทดลองเพื่อศึกษา ผลในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ *S. pullorum* หรือที่เรียกว่า โรคขี้ขาว โดย ใช้เชื้อ *Ent. faecium* J96 ที่แยกได้จากไก่สุ ขภาพดี และผ่านการทดสอบมาแล้วว่าสามารถผลิต แบคทีริโอซินและกรดแลคติกมายับยั้ง *S. pullorum* จากผลการทดลองสำหรับการให้เพื่อป้องกัน จะให้ *Ent. faecium* J96 โดยตรงทางปากลูกไก่อายุ 30 ชั่วโมง เมื่ออายุครบ 4 วัน จะให้เชื้อ *S. pullorum* M97 โดยตรงในกระเพาะพักของลูกไก่ ส่วนการทดสอบเพื่อรั กษาโรค จะให้ *Salmonella* แก่ลูกไก่ ตั้งแต่อายุ 30 ชั่วโมงก่อน แล้วตามด้วยการให้ *Ent. faecium* J96 ผลการวิจัยในการให้ *Ent. faecium* J96 เพื่อป้องกันโรคพบว่า ไก่มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 75 และสภาพของม้ามและตับก็ปกติด้วย ขณะที่กลุ่มควบคุมซึ่งให้เฉพาะ *Salmonella* ปรากฏอัตราการตายคิดเป็นร้อยละ 50 สำหรับการใช้เพื่อ การรักษาจะพบว่าไก่ตายทั้งหมด จากรายงานนี้แสดงให้เห็นว่า ลูกไก่แรกเกิดมีความเสี่ยงสูงต่อการ ติดเชื้อ *Salmonella* และการให้โปรไบโอติกจะมีส่วนช่วยให้อาการดีขึ้นได้ นอกจากนี้ยังมีการทดลอง จำนวนมากที่ให้ผลในทำนอง เดียวกันนี้ ที่พบว่าการเสริมโปรไบโอติกจะส่งผล ควบคุมและยับยั้ง การเจริญของ *Salmonella* ในลำไส้ไก่ได้ เช่น งานวิจัยของวัตกิน และมิวเลอร์ (Witkins; & Miller.

1983: 1772-1779) ได้ให้เชื้อ *Lb. acidophilus* เพื่อป้องกันและรักษาโรคจาก *S.* Typhimurium และ *S. aureus* โดยทำการกรอก *Lb. acidophilus* ทางปากแก่ไก่พันธุ์ Grey Leghorn อายุ 2 วัน ปริมาณ 1 มิลลิลิตร (10^8 CFU/ไก่ 1 ตัว) เมื่อไก่อายุ 4 วันจึงให้เชื้อก่อโรคทดสอบ (10^8-10^9 /ไก่ 1 ตัว) สายพันธุ์ละ 1 มิลลิลิตร และในกรณีเพื่อการรักษา ไก่จะได้รับเชื้อก่อโรคก่อน แล้วตา มด้วย *Lb. acidophilus* ระยะการให้ *Lb. acidophilus* ในลำดับต่อมาคือ เมื่อไก่อายุ 6, 8, 10, 12 และ 14 วัน ผลการทดลองพบว่า การใช้ *Lb. acidophilus* เพื่อป้องกันโรคติดเชื้อ สามารถลดอัตราการตายของไก่ลงได้มาก และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบ กับผลในการรักษาโรค อย่างไรก็ตาม *Lb. acidophilus* ก็สามารถกำจัดทั้ง *S.* Typhimurium และ *S. aureus* ได้ โดยพบว่าปริมาณของเชื้อก่อโรคทั้งสองสายพันธุ์ มีจำนวนลดลง ในขณะที่ *Lb. acidophilus* มีจำนวนเพิ่มขึ้น และเข้ายึดครองพื้นที่ในทางเดินอาหารไก่แทนจุลินทรีย์ก่อโ รคทั้งสอง การป้อน *Lb. acidophilus* ในรูปอาหารเหลว ความเข้มข้น 10^8 CFU/ไก่ 1 ตัว ให้ลูกไก่แรกเกิดทุก 2 วัน โดยดูความสามารถในการต้านทานการติดเชื้อ *S.* Typhimurium และ *S. aureus* ความเข้มข้น 10^9-10^{10} CFU/ไก่ 1 ตัว เปรียบเทียบการให้ในรูปการป้องกันและรักษาโ รค พบว่าการให้เพื่อป้องกันโรค โดยให้ *Lb. acidophilus* ก่อนการให้เชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิด สามารถลดอัตราการตายในไก่อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) พร้อม ทั้งสามารถลดจำนวนเชื้อโรคได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) มีการทดสอบยืนยันผลของ *Lactobacillus* ต่อการต้านทานการติ ดเชื้อ *Salmonella* โดยเสริมในรูปสารละลายนมในน้ำดื่ม ให้ทุก 3 วัน จนอายุครบ 15 วัน แบ่งเป็น 3 กลุ่มทดลอง แต่ละกลุ่มได้รับ *S. gallinarum, S. pullorum* และ *S.* Typhimrium ความเข้มข้น $2x10^5$ CFU/ไก่ 1 ตัว ผลการทดลองตรวจนับพบว่าจำนวน *Salmonella* ในกระเพาะพักและลำไส้ใหญ่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมไม่ได้รับโปรไบโอติก (Javed; Hameed; & Sildique. 1993: 254-257)

จากการทดลองทั้งหมด แสดงถึงผลดีในด้านต่างๆ จาก การนำโปรไบโอติกมาเสริมในอาหารสัตว์ และ สามารถนำมาเป็นแนวทางในการ ผลิตผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ ที่ไม่ก่อให้เกิ ดสารตกค้างในผลิตภัณฑ์ ซึ่งปัจจุบันโปรไบโอติก ถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์มาก โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันโรคและเร่งการเจริญเติ บโตของสัตว์ที่เลี้ยงในฟาร์ม และนำมาทดแทน สารกันเชื้อรา สารกันหืน สารเคมี และสารปฏิชีวนะต่างๆ (ชรินทร์ เขียวจรัส. 2539: 23-37) และจากประโยชน์ของโปรไบโอติกในด้านต่างๆ จึงควรนำมาส่งเสริม ให้เกษตรกรใช้ทดแทนสารปฏิชีวนะซึ่งนอกจากจะช่วยป้องกันโรคที่เกี่ยวกับทางเดินอาหารแล้วยังช่วยส่งเสริมสุขภาพของโฮสต์ให้ดีขึ้นอีกด้วย

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

คณะกรรมการบริหารสินค้าไก่เนื้อและผลิตภัณฑ์ . (2549). *ข้อมูลการผลิตและส่งออก* . สืบค้นเมื่อ 20 พฤษภาคม 2554, จาก http://www.dld.go.th/Board_chicken/dataproduct_export.html.

โครงการเรียนรู้เรื่องวิทยาศาสตร์โลกและอวกาศ (LESA Project). 2548. *ความชื้นสัมพัทธ์*. สืบค้นเมื่อ 1 เมษายน 2555, http://www.lesaproject.com/lesa/atmosphere/weather_station/sling_psychro/sling_phychrometer.doc.

จำรูญ มณีวรรณ; มงคล ถิรบุญยานนท์; และ กิตติพงษ์ ทิพยะ. (2553). *การใช้โปรไบโอติกเพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตและทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในแม่สุกรอุ้มท้องและแม่สุกรเลี้ยงลูก*. รายงานการวิจัย. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้. ถ่ายเอกสาร.

ชรินทร์ เขียวจรัส . (2539). *การใช้โปรไบโอติก เอนไซม์ และกรดอินทรีย์ในอาหารสัตว์ . ว. สัตวบาล* 6: 23-37.

ฐิติพงษ์ ธนะรัชติกานนท์ . (2539). *การใช้แลค ติกแอสิคแบคทีเรียเป็นโปรไบโอติกเสริม อาหารไก่* . วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย . กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ถ่ายเอกสาร.

ไตรมาศ บุญไทย; วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย; และ สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2550). *ผลของโปรไบโอติกต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ Vibrio และปริมาณแบคที เรียโปรไบโอติกระหว่างการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ* . 483-490. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45: สาขาประมง วันที่ 30 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2550. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปริยดา ตั๋นจักร . (2550). *การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มี คุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก* . วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

ปัญชลี ประคองศิลป์ . (2541). *การเปรียบเทียบการใช้โปรไบโอติกในการเลี้ยงไก่* . วิทยานิพน ธ์วิทยาศาสตร มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย . กรุงเทพฯ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย . ถ่ายเอกสาร.

เพิ่มศักดิ์ ศิริวรรณ; บัวเรียม มณีวรรณ์; และ เพ็ญแข วันไชยธนวงศ์. (2551). *ผลของการเสริม Lactobacillus reuteri ในอาหารต่อสมรรถภาพการผลิตและการย่อยได้ของโภชนะในไก่เนื้อ*. ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46: สาขาสัตว์ และสัตวแพทยศาสตร์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 64-70.

รุจา มาลัยพวง. (2544). *การผลิตโปรไบโอติกสำหรับอาหารไก่จากแบคทีเรียกรดแลกติกของไทย*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ถ่ายเอกสาร.

ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ; และ ฐิติพงศ์ ธนะรัชติการนนท์ . (2540). การใช้แลคติก แอสิดแบคทีเรีย เป็นโปรไบโอติกเพื่อเสริมอาหารไก่. *จุฬาวิจัย* 6(6): 10-13.

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. (2550). แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก. *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว* 23(2): 145-160.

Adlerberth, I.; Ahrne, S.; Johansson, M.L.; Molin, G.; Hanson, L.A.; & Wold, A.E. (1996). A mannosespecific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to human colonic cell line HT-29. *Appl. Environ. Microbiol*. 62(7): 2244-2251.

Al-Ahmad, A.; Pelz, K.; Schirrmeister, J.F.; Hellwig, E.; & Pukall, R. (2008). Characterization of the first oral *Vagococcus* isolated from a root-filled tooth with periradicular lesions. *Curr. Microbiol.* 57: 235-238.

Angel, R.; Dalloul, R.A.; Tamim, N.M.; Shellem, T.A.; & Doerr, J. (1999). Performance and nutrient use in broilers fed a lactobacillus-based probiotic. *Poult. Sci*. 78 (1): 58,98.

Atherton, D.; & Robins S. (1987). *Probiotics a European perspective*. In biotechnology in the feed industry. Edited by Lyons, T.P. Kentucky: Nicholasville.: 167-196.

Audisio, M.C.; Oliver, G.; & Apella, M.C. (2000). Protective effect of *Enterococcus faecium* J96, a potential probiotic strain on chicks infected with *Salmonella pullorum*. *J. Food Prot.* 63(10): 1333-1337.

Axelsson, L. (1998). *Lactic acid bacteria: classification and physiology*. In Lactic acid bacteria. Edited by Salminen, S.; von Wright, A.; & Ouwehand, A. 3 rd Edition. New York: Marcel Dekker, Inc.: 1-72.

Bank, J.G.; Broad, R.G.; & Sparks, N.H.C. (1986). Natural antimicrobial system and their potential in food preservation of the future. *Biotech. Appl. Biochem.* 8: 103-147.

Barrow, P.A.; Brooken, B.E.; Fuller, R.; & Newport, M.J. (1980). The attachment of bacteria to the gastric epithelium of the pig and its importance in the microecology of the intestine. *J. Appl. Bacteriol* 48: 147-154.

Bearso, S.; Bearason, B.; & Foster, J.W. (1997). Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS. Microbiol. Lett.* 147: 173-180.

Björkroth, K.J.; Schillinger, U.; Geisen, R.; Weiss, N.; Hoste, B.; Holzapfel, W.H.; Korkeala, H.J.; & Vandamme, P. (2002). Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. Nov., detected in food and clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 141-148.

Blomberg, L.; Henriksson, A.; & Conway, P.L. (1993). Inhibition of adhesion of *Escherichia coli* K88 to piglet ileal mucus by *Lactobacillus* sp. *Appl. Environ. Microbio.* 59: 34-39.

Brownell, J.R.; Sadler, W.W.; & Fanelli, M.J. (1969). Factors influencing the intestinal infection of chickens with *Salmonella* Typhimurium. *Br. Vet. J.* 13: 804-816.

Carolina, M. G.; Alejandra, M. L.; Cecilia, D.; & Gabriela, P. (2010). *Biotechnology of lactic acid bacteria : novel applications.* Edited by Fernanda, M.; Raúl, R. R.; & Graciela, M. V. 1st Edition. USA. John Wiley & Sons, Inc.: 132-136.

Cerniglia, G.J.; Goodling, A.C.; & Herbert, J.A. (1983). The response of layers to feeding *Lactobacillus* fermentation products. *Poutry Sci.* 62: 1399.

Chauviere, G.; Coconnier, M.H.; Kerneis, S.; Fourniat, J.; & Servin, A.L. (1992) Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1689-1699.

Choi, H.J.; Cheigh, C.I.; Kim, S.B.; Lee, J.C.; Lee, D.W.; Choi, S.W.; Park, J.M.; & Pyun, Y.R. (2002). *Weissella kimchii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 507-511.

Chung-Yi Wang; Pei-Rong Lin; Chang-Chai Ng; & Yuan-Tay Shyu. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe*. 16: 578-585.

Coconnier, M.H.; Klaenhammer, T.R.; Kernéis, S.; Bernet, M.F.; & Servin, A.L. (1992). Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2F04 on humen enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2034-2039.

Collado, M.C.; Meriluoto, J.; & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur Food Res Tech*. 226(5): 1065-1073.

Conway, P.L.; & Kjellberg, S. (1989). Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus fermentum* strain 737 to mouse stomach squamous epithelium. *J. Gen. Microbiol.* 135: 1175-1186.

Corrier D.E.; Nisbet, D.J.; Scanlan, C.M.; Hollister, A.G.; & DeLoach, J.R. (1995). Control of *Salmonella* Typhimurium colonization in broiler chicks with a continuous-flow characterized mixed culture of fecal bacteria. *Poult. Sci.* 74: 916.

Daeschel, M.A. (1992). *Procedures to detect antimicrobial activities of microorganisms.* In Food microbiology Origin. Edited by Ray, B.; & Daeschel, M. Press CRC.: 57-80.

Dessaet, S.R.; & Steenson, L.R. (1995). *Biotechnology of dairy Leuconostoc.* In biotechnology. Edited by Hui, Y.H.; & Khaehatouriam, G.G. USA: VCH. Publishers, Inc.: 665-698.

Devriese, L.A.; & Pot, B. (1995). *The Genus of Enterococcus,* In The genera of lactic acid bacteria. Edited by Wood, B.J.B.; & Holzapfel, W.H.; 2nd Edition. Glasgow: Blackie Academic & Professional.: 327-367.

Dick, L.M.; Dellaglio, T.E.; & Collins, M.D. (1995). Proposal to reclassify *Leuconostoc* as *Oenococcus oeni* (corring). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 395-397.

Goldsby, R.A.; Kindt, T.J.; & Osborne, B.A. (2000). *Kuby Immunology*. 4th Edition. New York: W.H. Freeman and Company, Inc.: 51.

EFSA. (2008). Technical guidance prepared by the panel on additives and products of substances used in animal feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA Journal* 732: 1-15.

Endo, T.; Nakano, M.; Shimizu, S.; Fukushima, M.; & Miyoshi, S. (1999). Effect of probiotic on the lipid metabolism of cocks fed on a cholesterol-enriched diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 63(9): 1569-1575.

Erko, S.; & Michael, G. (1991). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. The United States of America: John Wiley & Sons.

FAO/WHO. (2001). Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria (October 2001). *Food and agriculture organization of the United Nations, World Health Organization*. Retrieved October 10, 2011, from http://www.who.int/entity/foodsafety/publications/fs_management/en/ probiotics. pdf.

Francis, C.; Janky, D.M.; Arafa, A.S.; & Harms, R.H. (1978). Interrelationship of *Lactobacillus* and zinc bacitracin in diets of turkey poults. *Poultry Sci*. 57: 1687-1689.

Franz, C. M. A. P.; Du Toit, M.; Olasupo, N. A.; Schillinger, U.; & Holzapfel, W.H. (1998). plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from ready-to-eat salad. *Appl Microbiol*. 26(3): 231-235.

Fuller, R.; & Brooker, B.E. (1974). Lactobacilli which attach to the crop epithelium of the fowl. *Am. J. Clin. Nutr.* 27: 1305-1312.

Fuller, R. (1977). The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. *Brit. Poultry Sci*. 18: 85-94.

Fuller, R. 1989. Probiotic in man and animal. *J. Appl. Bacterio.* 66: 365-378.

Fuller, R. (Ed.). (1992). *Probiotics*. The scientific basis. London: Chapman & Hall.

Garriga, M.; Pascual, M.; Monfort, J.M.; & Hugas, M. (1998). Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. *J. Appl. Microbiol*. 84: 125-132.

Gaggìa, F.; Mattarelli, P.; & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol.* 141: S15-S28.

Goldsby, R.A.; Kindt, T.J.; & Osborne, B.A. (2000). *Kuby immunology*. 4th Edition. New York: W.H. Freeman and Company, Inc.: 55

Guo, X.H.; Kim, J.M.; Nam, H.M.; Park, S.Y.; & Kim, J.M. (2010). Screening Lactic Acid Bacteria from Swine Origins for Multistrain Probiotics Based on *in vitro* Functional Properties. *Anaerobe* 16(4): 321-326.

Gustafson, R.H.; & Bowen R.E. (1997). A review: antibiotic use in animal agriculture. *J. Appl. Bacteriol*. 83: 531-541.

Gusils, C.; González, S.; & Oliver, G. (1999). Some probiotic properties of chicken lactobacilli. *Can. J. Microbiol*. 45: 981-987.

Haddain, M.S.Y.; Abulrahim, S.M.; Hashlaoun, E.A.R.; & Robinson, P.K. (1996). The effect of *Lactobacillus acidophilus* on the production and chemical composition of hen's eggs. *Poultry Sci*. 75: 494-497.

Hardie, J.M.; & Whiley, R.A. (1995). *The genus of Streptococcus.* In The genera of lactic acid bacteria. Edited by Wood, B.J.B.; & Holzapfel, W.H. 2nd Edition. Glasgow: Blackie Academic & Professional.: 55-124.

Harrigan, W.F. (1998). *Laboratory method in food microbiology*. 3 rd Edition. New York: Academic Press.: 346-348.

Henriksson, G.; Pettersson, G.; Johansson, G.; Ruiz, A.; & Uzcategui, E. (1991). Cellobiose oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* can be cleaved by papain into two domains. *Eur. J. Biochem*. 196: 101-106.

Jakava-Viljanen; & Palva. (2007). Isolate of surface (S-) layer protein carrying Lactobacillus species from porcine intestine and faeces and characterization of their adhesion properties to different host tissues. *VETMIC*. 124: 1-27

Javed, T.; Siddique, M.; & Hameed, A. (1994). Occurrence of *Salmonella* in avifauna. *Pak. Vet. J*. 14(4): 254-257.

Jay, J.M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol*. 44: 525-532.

Jay, M.T. (1996). *Modern food microbiology*. New York: International Thomson Publishing.: 110-113.

Jin, L.Z.; Ho, Y.W.; Abdullah, N.; Ali, M.A.; & Jalaludin, S. (1996). Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. *Lett. Appl. Microbiol*. 23: 67-71.

Jin, L.Z.; Ho, Y.W.; Abdullah, N.; Ali, M.A.; & Jalaundin, S. (1998). Effects of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. *Animal Feed Sci. Tech*. 70: 197-209.

Jin, L.Z.; Ho, Y.W.; Abdullah, N.; & Jalaludin, S. (1998). Acid and Bile Tolerance of *Lactobacillus* Isolated from Chicken Intestine. *Lett. Appl. Microbiol*. 27(3): 183-195.

Jin, L.Z.; Ho, Y.W.; Abdullah, N.; Ali, M.A.; & Jalaundin, S. (2000). Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. *Poultry Sci.* 79: 886-891.

Johnson, J.L. (1984). *Bacterial classification III. Nucleic acids in bacterial classification.* In Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. Edited by Krieg, N.R.; & Holt, J.G. Baltimore: Williams & Wilkins.: 8-11.

Josephsen, J.; & Nielsen, E.W. (1988). Plasmid profiles and bacteriophage sensitivity of bacteria of a cheddar starter used for five years without rotation. *Milchwissenschaft* 43: 219-223.

Kabir, S.M.L.; Rahman, M.M.; Rahman, M.B.; Rahman, M.M.; & Ahmed, S.U. (2004). The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. *Int. J. Poult. Sci.* 3(5): 361-364.

Kamau, D.N.; Doores, S.; & Pruitt, K.M. (1990). Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenase* and *Staphylococcus aureus* by lactoperoxidase system. *Appl. Environ. Microbiol.* 5: 2711-2716.

Kandler, O.; & Weiss, N. (1986). *Genus Lactobacillus beijerinck* 1901, In Bergey 's manual of systematic bacteriology, Vol. 2. Edited by Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E.; & Holt, J.G. Baltimore: Williams and Wilkins.: 1209-1234.

Kang, D.H.; & Fung, D.Y.C. (1999). Effect of diacetyl on controlling *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in the presence of starter culture in a laboratory medium and during meat fermentation. *J. Food Prot*. 62(9): 975-979.

Kapczynski, D.R.; Meinersmann, R.J.; & Lee, M.D. (2000). Adherence of *Lactobacillus* to intestinal 407 cells in culture correlates with fibronectin binding. *Curr. Microbiol*. 41: 136-141.

Kastner, S.; Perreten, V.; Bleuler, H.; Hugenschmidt, G.; Lacroix, C.; & Meile, L. (2006). Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Syst. Appl. Microbial.* 29: 145-155.

Kontula, P.; Jaskari, J.; Nollet, L.; Smet, D.I.; Wright, V.A.; Poutanen, K.; & Mattila-Sand-Holm, T. (1998). The colonization of a stimulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on a fermented oat bran product: effects on the gastrointestinal microbiota. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 246-252.

Kos, B.; Suskovic, J.; Simpraga, M.; Frece, J.; & Matosic, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92. *J. Appl. Microbiol.* 94: 981- 987

Kumprecht, I.; & Zobac, P. (1998). The effect of probiotic preparations containing *Saccharomyces cerevisiae* and *Enterococcus faecium* in diets with different levels of B-vitamins on chicken broiler performance. *Zivocina-Vyrobc*. 43: 63-70.

Lee, J.-S.; Lee, K.C.; Ahn, J.-S.: Mheen, T.-I. Pyun, Y.-R.; & Park, Y.-.H. (2002). *Weissella koreensis* sp. Nov., isolated from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1257-1261.

Lilly, D.M.; & Stillwell, R.H. (1965). Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147: 747-748.

Lindgren, S.E.; & Dobrogosz, W.J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microb. Rev*. 87: 149-164.

Lioyd, A.B.; Cumming, R.B.; & Kent, R.D. (1997). Prevention of *Salmonella* Typhimurium infection in poultry by pretreatment of chickens and poultry with intestinal extracts. *Aust. Vet. J.* 53: 82.

Mach, T. (2006). Clinical usefulness of probiotics in inflammatory bowel diseases. *J. Phys. Pharm.* 57(9): 23-33.

Magnusson, J.; Jonsson, H.; Schnürer, J.; & Roos, S. (2002). *Weissella* soli sp. Nov. a lactic acid bacterium isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 52: 831-834.

Mayra-Makinen, A; & Bigret, M. (1998). *Industrial use and production of lactic acid bacteria.* In lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects. Edited by Salminen, S. New York: Marcel Dekker Inc.: 73-102.

Metchnikoff, E. (1907). *Essais Optimistes*. Paris. In the prolongation of life. Optimistic studies. Edited by Mitchell, P.C. London: Heinemann.

Miles, R.D.; Arafa, A.S.; Harms, R.H.; Carlson, C.W.; Red, B.L. & Crawford, J.S. (1981). Effects of living non freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* culture on performance, egg quality and gut microflora in commercial layers. *Poult. Sci.* 60: 693-704.

Morgensen, G.; Salminen, S.; O'Brien, J.; Ouwehand, A.C.; Holzapfel, W.H.; & Shortt, C. (2002). Inventory of microorganisms with a documented history of use in food. *Bull. Int. Dairy Fed.* 377: 10-18.

Mukai, T.; Arihara, K.; & Itoh, H. (1992). Lectin-link activity of *Lactobacillus acidophilus* strain JCM1026. *FEMS Microbiol. Lett*. 98: 71-77.

Murry, A.C.; Hinton, A.; & Morrison, H. (2004). Inhibition of growth of *Escherichia coli Salmonella typhimurium* and *Clostridium perfringens* on chicken feed media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Poult. Sci.* 3(9): 603-607.

Murry, A.C.; Hinton, A.; & Buh, R.J. (2006). Effect of botanical probiotic containing Lactobacilli on growth performance and populations of bacteria in the ceca, cloaca, and carcass rinse of broiler chickens. *Int. J. Poult. Sci*. 5(4): 344-350.

Nisbet, D.J.; Corrier, D.E.; & DeLoach, J.R. (1995). *Probiotic for control of Salmonella*. Patent No. 5,478,557. December.

Nousiainen, J.; & Setala, J. (1998). *Lactic acid bacteria as animal probiotics*. In Lactic acid bacteria. Edited by Salminen, S.; von Wright, A.; & Ouwehand, A. 3 rd Edition. New York: Marcel Dekker, Inc.: 431-473.

Numi, E.; & Rantala M. (1973). Newaspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature, London* 241: 210-211.

Orla-Jensen, S. (1919). *The lactic acid bacteria.* Copenhagen: Host and Son.

Ouwehand, C.A. (1998). *Antimicrobial components from lactic acid bacteria*. In Lactic acid bacteria. Edited by Salminen, S.; von Wright, A.; & Ouwehand, A. 3 rd Edition. New York: Marcel Dekker, Inc.: 139-159.

Ouwehand, A.C.; Salminen, S.; & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 279-289.

Ouwehand, A.C.; & Vesterlund, S. (2004). *Antimicrobial components from lactic acid bacteria*. In Lactic acid bacteria. Edited by Salminen, S.; von Wright, A.; & Ouwehand, A. 3 rd Edition. New York: Marcel Dekker, Inc.: 377-378.

Parker, G.A. (1974). Assessment strategy and the evolution of animal conflicts. *J. Theor. Biol.* 47: 223-243.

Pascual, M.; Hugas, M.; Badiola, J.I.; Monfort, J.M.; & Garriga, M. (1999). *Lactobacillus salivarius* CC2197 prevent *Salmonella enteritudis* colonization in chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(11): 4981-4986.

Perdigón, G.; De Macias, M.E.N.; Alvarez, S.; Oliver, G.; & De Ruiz Holgado, A.P. (1986). Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect. Immun*. 53: 404-410.

Pot, B.; Hertel, C.; Ludwig, W.; Descheemaeker, P.; Kersters, K.; & Schleifer, K.H. (1993). Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. johnsonii* strain by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotides probe hybridization. *J. Gen. Microbiol.* 139: 513-517.

Reid, G.; Jass, J.; Sebulsky, M.T.; & Cormick, M.J.K. (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev*. 16: 658-672.

Reid, G. (2008). Probiotics and prebiotics-progress and challenges. *Int. Dairy J*. 18: 969-975.

Ringo, E.; & Gatesoupe, F.J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: review. *Aquaculture* 160: 177-203.

Ripamonti, B.; Agazzi, A.; Bersani, C.; Dea, D.P.; Pecorini, C.; Pirani, S.; Rebucci, R.; Savoini, G.; Stella, S.; Stenico, A.; Tirloni, E.; & Domeneghini, C. (2011). Screening of species specific lactic acid bacteria for veal calves multistrain probiotic adjuncts. *Anaerobe*: 1-9.

Rosenberg, M.; Gutnick, D.; & Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* 9: 29-33.

Rubin, A.H.; Terasaki, M.; & Sanui, H. (1978). Magnesium reverses inhibitory effects of calcium deprivation on coordinate response of 3T3 cells to serum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75(9): 4379-4383.

Ryu, K.S.; Song, H.J.; & Kim, S.H. (1999). *Effect of feeding probiotics on performance and intestinal microflora of laying hen*. In Poultry Sci. 88th annual meeting abstracts. August 8-11, 2000. Springdale, Arkansas.: 99.

Sanders, M.E. (2000). Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *J. Nutr*. 130: 384S-390S.

Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, G.T.; Mullis, K.B.; & Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-494.

Salmond, C.V.; Kroll, R.G.; & Booth, I.R. (1984). The effect of food preservatives on pH homoeostasis *Escherichia coli. J. Gen. Microbiol*. 130: 1845.

Schillinger, U.; & Lücke, F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol*. 55: 1901-1906.

Schleifer, K.H. (1987). Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 46: 201-203.

Schleifer, K.H.; & Ludwing, W. (1995). *Phylogenetic relationship of lactic acid bacteria*, In The genera of lactic acid bacteria. Edited by Wood, B.J.B.; & Holzapfel, W.H. 2nd Edition. Glasgow: Blackie Academic & Professional.: 7-19.

Simpson, W.J.; & Taguchi, H. (1995). The genus *Pediococcus* with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. In The genera of lactic acid bacteria. Edited by Wood, B.J.B.; & Holzapfel, W.H. 2nd Edition. Glasgow: Blackie Academic & Professional.: 125-164.

Singleton, P.; & Sainsbury, D. (1988). *Dictionary of microbiology and molecular biology*. Singapore: John Wiley; & Sons.: 485-486.

Stiles, M.E.; & Hastings, J.W. (1991). Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends Food Sci. Technol.* 2: 247-251.

Stiles, M.E.; & Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.

Tanasupawat, S.; Shida, O; Okada, S; & Komagata, K. (2000). *Lactobacillus acidipiscis* sp. Nov. and *Weissella thailandensis* sp. Nov., isolated from fermented fish in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1479-1485.

Tahia, S.U.; Porubean, R.S.; & Gukstrom, T. (1983). Application of *Lactobacillus acidophilus* in water of growing turkey poults examined. *Feed Stuff.* 55(2): 22-27.

Tannis, A. (2008). *Probiotic rescue*. Ontario: John Wiley; & Sons.: 32.

Tannock, G.W. (1992). *Genetic manipulation of gut microoraganisms*. Probiotics. In The Scientific Basis. Edited by Fuller, R. London: Chapman; & Hall: 185-207.

Taranto, M.P.; Fernandez-Murga, M.L.; Lorca, G.; & De Valdez, G.F. (2006). Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for Oral Administration. *Res. Microbiol.* 157(8): 720-725.

Wadstrom, F.; Andersson, K.; Sydow, M.; Axelsson, L.; Lindgren, S.; & Gullmar, B. (1987). Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J. Appl. Bacteriol.* 62: 513-520.

Watkins, B.A.; Miller, B.F.; & Nell, D.H. (1982). *In vitro* inhibitory effects of *Lactobacillus* against pathogenic *Escherichia coli* in gnotobiotic chicks. *Poultry Sci.* 61: 1298-1308.

Watkins, B.A.; & Miller, B.F. (1983). Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in ghotobiotic sicks. *Poultry Sci.* 62: 1772-1779.

Watson, R.R.; & Preedy, V.R. (2010). *Bioactive foods in promoting health*: probiotics and prebiotics. USA: Elsevier Inc.

Wollowski, I.; Rechkemmer, G; & Pool-Zobel, B.L. (2001). Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 451S-455S.

Xu, C.L.; Ji, C.; Ma, T. Q; Hao, K.; Jim, Z.Y.; & Li, K. (2006). Effect of a dried *Bacillus subtilis* culture on egg quality. *Poult. Sci.* 85: 364-368.

Yan, F; & Polk, D.B. (2006). Probiotics as functional food in the treatment of diarrhea. *Curr. Opin. Nutr. Metab. Care.* 9: 717-721.

Yeo, J.; & Kim, K.I. (1997). Effect of feeding diets containing and antibiotic, probiotic, of yucca extract on growth and intestinal urease activity in broiler chicks. *Poultry Sci.* 76: 381-385.

Yin, Q.; & Zheng, Q. (2005). Isolation and identification of the dominant *Lactobacillus* in gut and faces of pig using carbohydrate fermentation and 16S rDNA Analysis. *J. Bioscience. Bioeng*. 99(1): 67-68.

Yu, B.; & Tsen, H. (1993). *Lactobacillus* cells in the rabibit digestive tract and the factors affecting their distribution. *J. Appl. Bacteriol*. 75(3): 75.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียม

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth

Peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Diammonium hydrogen citrate	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ให้เติมวุ้นผงลงไป 15 กรัมแต่ถ้าเตรียมเป็น MRS soft agar ให้เติมวุ้นผงลงไป 0.5 กรัม

2. สูตรอาหารไก่ผสม

ข้าวโพด	52.67	กิโลกรัม
กากถั่วเหลือง	39.53	กิโลกรัม
น้ำมันพืช	3.50	กิโลกรัม
เปลือกหอย	1.20	กิโลกรัม
ไดแคลเซียมฟอสเฟต	2.20	กิโลกรัม
เมไธโอนีน	0.15	กิโลกรัม
เกลือ	0.50	กิโลกรัม
แร่ธาตุไวตามิน	0.25	กิโลกรัม

3. Nutrient agar (NA)

Peptone	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ NA agar ให้เติมวุ้นผงลงไป 15 กรัม แต่ถ้าเตรียมเป็น NA soft agar ให้เติมวุ้นผงลงไป 0.5 กรัม

4. Eosin Methylene Blue Agar (EMB agar)

Peptone	10	กรัม
Lactose	5	กรัม
Sucrose	5	กรัม
K_2HPO_4	2	กรัม
Eosin	0.4	กรัม
Methylene blue	0.065	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

5. Salmonella - Shigella agar (SS agar)

Beef extract	5	กรัม
Peptone	5	กรัม
Lactose	10	กรัม
Bile salt	8.5	กรัม
Sodium citrate	8.5	กรัม
Sodium thiosulfate	8.5	กรัม
Ferric citrate	1.0	กรัม
Brilliant green	0.00022	กรัม

Neutral red	0.025	กรัม
Agar	13.5	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
บัฟเฟอร์และวิธีการเตรียมสาร

ภาคผนวก ข

บัฟเฟอร์และสารเคมีที่ใช้

1. 50X TAE buffer

Tris- HCl (pH 8)	242	กรัม
Glacial acetic acid	57.1	กรัม
EDTA	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีเมื่อจะใช้ให้ทำการเจือจางเป็น 0.5X ด้วยน้ำกลั่น

2. Blue Mix DNA polymerase mastermix

10 mM KCl

2 mM $MgSO_4 7H_2O$

20 mMTris-HCl (pH 8.8)

0.1% Triton X-100

100 mM $(NH_4)_2SO_4$

0.1 mg/ml BSA

0.2 mMdNTP mix

1.25 U RBC *taq* DNA polymerase

3. Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.2

Na_2HPO_4	1.44	กรัม
KH_2PO_4	0.24	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. 1M HCl

Hydrochloric acid	8.7	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	91.3	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

ตารางเทียบค่าความชื้นสัมพัทธ์

ตารางเทียบค่าความชื้นสัมพัทธ์

อุณหภูมิกระเปาะแห้ง (°C)	ความชื้นสัมพัทธ์ (%)																				
	ผลต่างของอุณหภูมิกระเปาะเปียก และกระเปาะแห้ง (อุณหภูมิกระเปาะแห้ง - อุณหภูมิกระเปาะเปียก)																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
0	81																				
2	83	67																			
4	85	70	56																		
6	86	72	59	46																	
8	87	74	62	51	39																
10	88	76	65	54	43	33															
12	88	78	67	57	48	38	28														
14	89	79	69	60	50	41	33	25													
16	90	80	71	62	54	45	37	29	21												
18	91	81	72	64	56	48	40	33	26	19											
20	91	82	74	66	58	51	44	36	30	23	17										
22	92	83	75	68	60	53	46	40	33	27	21	15									
24	92	84	76	69	62	55	49	42	36	30	25	20	14								
26	92	85	77	70	64	57	51	45	39	34	28	23	18	13							
28	93	86	78	71	65	59	53	45	42	36	31	26	21	17	12						
30	93	86	79	72	66	61	55	49	44	39	34	29	25	20	16	12					
32	93	86	80	73	68	62	56	51	46	41	36	32	27	22	19	14	11				
34	93	86	81	74	69	63	58	52	48	43	38	34	30	26	22	18	14	11			
36	94	87	81	75	69	64	59	54	50	44	40	36	32	28	24	21	17	13	10		
38	94	87	82	76	70	66	60	55	51	46	42	38	34	30	26	23	20	16	13	10	
40	94	89	82	76	71	67	61	57	52	48	44	40	36	33	29	25	22	19	16	13	10

ที่มา: โครงการเรียนรู้เรื่องวิทยาศาสตร์โลกและอวกาศ (LESA Project). 2548. *ความชื้นสัมพัทธ์*. http://www.lesaproject.com/lesa/atmosphere/weather_station/sling_psychro/sling_phychrometer.doc.: Online.

ภาคผนวก ง

แสดงค่าน้ำหนักไก่ตลอดการทดลอง

1. แสดงค่าน้ำหนักไก่ในกลุ่มทดลองที่ 1

น้ำหนักไก่กลุ่มที่ 1								
	อายุ 7 วัน	อายุ 10 วัน	อายุ 13 วัน	อายุ 16 วัน	อายุ 19 วัน	อายุ 22 วัน	อายุ 25 วัน	อายุ 28 วัน
ตัวที่	28-Mar	31-Mar	3-Apr	6-Apr	9-Apr	12-Apr	15-Apr	18-Apr
1	210	267	362	454	630	830	1000	1100
2	210	268	364	549	719	955	1090	1360
3	186	240	314	439	556	715	810	860
4	180	266	358	515	682	860	1070	1140
5	220	259	360	468	609	780	1100	1190
6	198	248	358	498	647	835	1049	1250
Mean	204	262.5	359	483	638.5	832.5	1059.5	1165
AVERAGE	200.66667	258	352.66667	487.16667	640.5	829.16667	1019.8333	1150

2. แสดงค่าน้ำหนักไก่ในกลุ่มทดลองที่ 2

น้ำหนักไก่กลุ่มที่ 2								
	อายุ 7 วัน	อายุ 10 วัน	อายุ 13 วัน	อายุ 16 วัน	อายุ 19 วัน	อายุ 22 วัน	อายุ 25 วัน	อายุ 28 วัน
ตัวที่	28-Mar	31-Mar	3-Apr	6-Apr	9-Apr	12-Apr	15-Apr	18-Apr
1	180	205	264	384	505	690	1040	1110
2	170	234	339	478	655	865	1060	1270
3	220	252	330	468	625	829	1050	1220
4	178	223	308	438	555	740	915	1110
5	202	238	336	482	600	775	950	1140
6	190	218	292	428	605	810	1100	1200
Mean	185	228.5	319	453	602.5	792.5	1045	1170
AVERAGE	190	228.33333	311.5	446.33333	590.83333	784.83333	1019.1667	1175

3. แสดงค่าน้ำหนักไก่ในกลุ่มทดลองที่ 3

น้ำหนักไก่กลุ่มที่ 3								
	อายุ 7 วัน	อายุ 10 วัน	อายุ 13 วัน	อายุ 16 วัน	อายุ 19 วัน	อายุ 22 วัน	อายุ 25 วัน	อายุ 28 วัน
ตัวที่	28-Mar	31-Mar	3-Apr	6-Apr	9-Apr	12-Apr	15-Apr	18-Apr
1	188	218	316	458	620	814	1035	1115
2	200	206	300	438	584	766	1050	1310
3	202	225	328	480	651	845	1050	1210
4	202	230	300	430	565	775	945	1090
5	232	258	358	460	590	810	1035	1130
6	218	246	344	510	625	860	1070	1280
Mean	202	227.5	322	459	605	812	1042.5	1170
AVERAGE	207	230.5	324.33333	462.66667	605.83333	811.66667	1030.8333	1189.1667

4. แสดงค่าน้ำหนักไก่ในกลุ่มทดลองที่ 4

น้ำหนักไก่กลุ่มที่ 4								
	อายุ 7 วัน	อายุ 10 วัน	อายุ 13 วัน	อายุ 16 วัน	อายุ 19 วัน	อายุ 22 วัน	อายุ 25 วัน	อายุ 28 วัน
ตัวที่	28-Mar	31-Mar	3-Apr	6-Apr	9-Apr	12-Apr	15-Apr	18-Apr
1	198	234	340	479	660	820	1050	1110
2	210	242	356	492	669	871	1100	1195
3	188	220	310	442	590	792	985	1110
4	216	250	318	460	599	805	980	1150
5	222	252	346	446	580	765	955	1140
6	208	229	334	435	628	825	1200	1240
Mean	209	238	337	453	613.5	812.5	1017.5	1145
AVERAGE	207	237.83333	334	459	621	813	1045	1157.5

5. แสดงค่าน้ำหนักไก่ในกลุ่มทดลองที่ 5

น้ำหนักไก่กลุ่มที่ 5								
	อายุ 7 วัน	อายุ 10 วัน	อายุ 13 วัน	อายุ 16 วัน	อายุ 19 วัน	อายุ 22 วัน	อายุ 25 วัน	อายุ 28 วัน
ตัวที่	28-Mar	31-Mar	3-Apr	6-Apr	9-Apr	12-Apr	15-Apr	18-Apr
1	176	201	280	379	549	790	960	1100
2	202	231	296	410	545	745	940	1110
3	210	236	328	400	480	712	945	1240
4	182	224	312	394	540	695	910	1090
5	208	233	328	460	567	615	815	1130
6	182	214	316	464	545	750	949	1200
Mean	192	227.5	314	405	545	728.5	942.5	1120
AVERAGE	193.33333	223.16667	310	417.83333	537.66667	717.83333	919.83333	1145

6. แสดงค่าน้ำหนักไก่ในกลุ่มทดลองที่ 6

น้ำหนักไก่กลุ่มที่ 6								
	อายุ 7 วัน	อายุ 10 วัน	อายุ 13 วัน	อายุ 16 วัน	อายุ 19 วัน	อายุ 22 วัน	อายุ 25 วัน	อายุ 28 วัน
ตัวที่	28-Mar	31-Mar	3-Apr	6-Apr	9-Apr	12-Apr	15-Apr	18-Apr
1	226	260	356	432	585	805	1000	1170
2	188	221	320	480	650	855	1080	1300
3	208	234	326	478	625	845	1095	1230
4	208	228	320	418	532	690	890	1000
5	202	240	328	478	655	875	1120	1280
6	198	228	320	476	587	815	1035	1200
Mean	205	231	323	477	606	830	1057.5	1215
AVERAGE	205	235.16667	328.33333	460.33333	605.66667	814.16667	1036.6667	1196.6667

7. แสดงค่าน้ำหนักไก่ในกลุ่มทดลองที่ 7

น้ำหนักไก่กลุ่มที่ 7								
	อายุ 7 วัน	อายุ 10 วัน	อายุ 13 วัน	อายุ 16 วัน	อายุ 19 วัน	อายุ 22 วัน	อายุ 25 วัน	อายุ 28 วัน
ตัวที่	28-Mar	31-Mar	3-Apr	6-Apr	9-Apr	12-Apr	15-Apr	18-Apr
1	198	239	356	488	640	815	1030	1150
2	190	236	344	496	664	885	1000	1200
3	196	238	348	494	664	875	1095	1290
4	182	212	306	450	570	760	1040	1100
5	170	212	278	400	539	695	885	1200
6	210	237	338	478	621	805	1000	1160
Mean	193	236.5	341	483	630.5	810	1015	1180
AVERAGE	191	229	328.33333	467.66667	616.33333	805.83333	1008.3333	1183.3333

8. แสดงค่าน้ำหนักไก่ในกลุ่มทดลองที่ 8

น้ำหนักไก่กลุ่มที่ 8								
	อายุ 7 วัน	อายุ 10 วัน	อายุ 13 วัน	อายุ 16 วัน	อายุ 19 วัน	อายุ 22 วัน	อายุ 25 วัน	อายุ 28 วัน
ตัวที่	28-Mar	31-Mar	3-Apr	6-Apr	9-Apr	12-Apr	15-Apr	18-Apr
1	192	224	328	478	651	840	1050	1120
2	192	240	340	458	596	805	1100	1100
3	232	268	372	525	699	870	1110	1160
4	232	260	362	497	635	840	1060	1240
5	206	245	335	480	640	850	1050	1230
6	204	244	342	490	605	840	1050	1250
Mean	205	244.5	341	485	637.5	840	1055	1195
AVERAGE	209.66667	246.83333	346.5	488	637.66667	840.83333	1070	1183.3333

ภาคผนวก จ

แสดงผลสถิติของการศึกษา

1. แสดงผลสถิติของน้ำหนักไก่

(I) group		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-25.0000	53.03366	.640	-132.1850	82.1850
	3.00	-39.1667	53.03366	.465	-146.3517	68.0184
	4.00	-7.5000	53.03366	.888	-114.6850	99.6850
	5.00	5.0000	53.03366	.925	-102.1850	112.1850
	6.00	-46.6667	53.03366	.384	-153.8517	60.5184
	7.00	-33.3333	53.03366	.533	-140.5184	73.8517
	8.00	-33.3333	53.03366	.533	-140.5184	73.8517
2.00	1.00	25.0000	53.03366	.640	-82.1850	132.1850
	3.00	-14.1667	53.03366	.791	-121.3517	93.0184
	4.00	17.5000	53.03366	.743	-89.6850	124.6850
	5.00	30.0000	53.03366	.575	-77.1850	137.1850
	6.00	-21.6667	53.03366	.685	-128.8517	85.5184
	7.00	-8.3333	53.03366	.876	-115.5184	98.8517
	8.00	-8.3333	53.03366	.876	-115.5184	98.8517
3.00	1.00	39.1667	53.03366	.465	-68.0184	146.3517
	2.00	14.1667	53.03366	.791	-93.0184	121.3517
	4.00	31.6667	53.03366	.554	-75.5184	138.8517
	5.00	44.1667	53.03366	.410	-63.0184	151.3517
	6.00	-7.5000	53.03366	.888	-114.6850	99.6850
	7.00	5.8333	53.03366	.913	-101.3517	113.0184
	8.00	5.8333	53.03366	.913	-101.3517	113.0184
4.00	1.00	7.5000	53.03366	.888	-99.6850	114.6850
	2.00	-17.5000	53.03366	.743	-124.6850	89.6850
	3.00	-31.6667	53.03366	.554	-138.8517	75.5184
	5.00	12.5000	53.03366	.815	-94.6850	119.6850
	6.00	-39.1667	53.03366	.465	-146.3517	68.0184
	7.00	-25.8333	53.03366	.629	-133.0184	81.3517
	8.00	-25.8333	53.03366	.629	-133.0184	81.3517
5.00	1.00	-5.0000	53.03366	.925	-112.1850	102.1850
	2.00	-30.0000	53.03366	.575	-137.1850	77.1850
	3.00	-44.1667	53.03366	.410	-151.3517	63.0184
	4.00	-12.5000	53.03366	.815	-119.6850	94.6850
	6.00	-51.6667	53.03366	.336	-158.8517	55.5184
	7.00	-38.3333	53.03366	.474	-145.5184	68.8517
	8.00	-38.3333	53.03366	.474	-145.5184	68.8517
6.00	1.00	46.6667	53.03366	.384	-60.5184	153.8517
	2.00	21.6667	53.03366	.685	-85.5184	128.8517
	3.00	7.5000	53.03366	.888	-99.6850	114.6850
	4.00	39.1667	53.03366	.465	-68.0184	146.3517
	5.00	51.6667	53.03366	.336	-55.5184	158.8517
	7.00	13.3333	53.03366	.803	-93.8517	120.5184
	8.00	13.3333	53.03366	.803	-93.8517	120.5184
7.00	1.00	33.3333	53.03366	.533	-73.8517	140.5184
	2.00	8.3333	53.03366	.876	-98.8517	115.5184
	3.00	-5.8333	53.03366	.913	-113.0184	101.3517
	4.00	25.8333	53.03366	.629	-81.3517	133.0184
	5.00	38.3333	53.03366	.474	-68.8517	145.5184
	6.00	-13.3333	53.03366	.803	-120.5184	93.8517
	8.00	0.0000	53.03366	1.000	-107.1850	107.1850
8.00	1.00	33.3333	53.03366	.533	-73.8517	140.5184
	2.00	8.3333	53.03366	.876	-98.8517	115.5184
	3.00	-5.8333	53.03366	.913	-113.0184	101.3517
	4.00	25.8333	53.03366	.629	-81.3517	133.0184
	5.00	38.3333	53.03366	.474	-68.8517	145.5184
	6.00	-13.3333	53.03366	.803	-120.5184	93.8517
	7.00	0.0000	53.03366	1.000	-107.1850	107.1850

2. แสดงผลสถิติของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกต่อกรัมอุจจาระ

(I) Group		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-2676180.0000*	437066.09679	.000	-3535413.6345	-1816946.3655
	3.00	-2927946.6667*	437066.09679	.000	-3787180.3012	-2068713.0322
	4.00	-3190740.0000*	437066.09679	.000	-4049973.6345	-2331506.3655
	5.00	-4245901.6667*	437066.09679	.000	-5105135.3012	-3386668.0322
	6.00	-3199300.0000*	437066.09679	.000	-4058533.6345	-2340066.3655
	7.00	-3349360.0000*	437066.09679	.000	-4208593.6345	-2490126.3655
	8.00	-5389853.3333*	437066.09679	.000	-6249086.9678	-4530619.6988
2.00	1.00	2676180.0000*	437066.09679	.000	1816946.3655	3535413.6345
	3.00	-251766.6667	437066.09679	.565	-1111000.3012	607466.9678
	4.00	-514560.0000	437066.09679	.240	-1373793.6345	344673.6345
	5.00	-1569721.6667*	437066.09679	.000	-2428955.3012	-710488.0322
	6.00	-523120.0000	437066.09679	.232	-1382353.6345	336113.6345
	7.00	-673180.0000	437066.09679	.124	-1532413.6345	186053.6345
	8.00	-2713673.3333*	437066.09679	.000	-3572906.9678	-1854439.6988
3.00	1.00	2927946.6667*	437066.09679	.000	2068713.0322	3787180.3012
	2.00	251766.6667	437066.09679	.565	-607466.9678	1111000.3012
	4.00	-262793.3333	437066.09679	.548	-1122026.9678	596440.3012
	5.00	-1317955.0000*	437066.09679	.003	-2177188.6345	-458721.3655
	6.00	-271353.3333	437066.09679	.535	-1130586.9678	587880.3012
	7.00	-421413.3333	437066.09679	.336	-1280646.9678	437820.3012
	8.00	-2461906.6667*	437066.09679	.000	-3321140.3012	-1602673.0322
4.00	1.00	3190740.0000*	437066.09679	.000	2331506.3655	4049973.6345
	2.00	514560.0000	437066.09679	.240	-344673.6345	1373793.6345
	3.00	262793.3333	437066.09679	.548	-596440.3012	1122026.9678
	5.00	-1055161.6667*	437066.09679	.016	-1914395.3012	-195928.0322
	6.00	-8560.0000	437066.09679	.984	-867793.6345	850673.6345
	7.00	-158620.0000	437066.09679	.717	-1017853.6345	700613.6345
	8.00	-2199113.3333*	437066.09679	.000	-3058346.9678	-1339879.6988
5.00	1.00	4245901.6667*	437066.09679	.000	3386668.0322	5105135.3012
	2.00	1569721.6667*	437066.09679	.000	710488.0322	2428955.3012
	3.00	1317955.0000*	437066.09679	.003	458721.3655	2177188.6345
	4.00	1055161.6667*	437066.09679	.016	195928.0322	1914395.3012
	6.00	1046601.6667*	437066.09679	.017	187368.0322	1905835.3012
	7.00	896541.6667*	437066.09679	.041	37308.0322	1755775.3012
	8.00	-1143951.6667*	437066.09679	.009	-2003185.3012	-284718.0322
6.00	1.00	3199300.0000*	437066.09679	.000	2340066.3655	4058533.6345
	2.00	523120.0000	437066.09679	.232	-336113.6345	1382353.6345
	3.00	271353.3333	437066.09679	.535	-587880.3012	1130586.9678
	4.00	8560.0000	437066.09679	.984	-850673.6345	867793.6345
	5.00	-1046601.6667*	437066.09679	.017	-1905835.3012	-187368.0322
	7.00	-150060.0000	437066.09679	.732	-1009293.6345	709173.6345
	8.00	-2190553.3333*	437066.09679	.000	-3049786.9678	-1331319.6988
7.00	1.00	3349360.0000*	437066.09679	.000	2490126.3655	4208593.6345
	2.00	673180.0000	437066.09679	.124	-186053.6345	1532413.6345
	3.00	421413.3333	437066.09679	.336	-437820.3012	1280646.9678
	4.00	158620.0000	437066.09679	.717	-700613.6345	1017853.6345
	5.00	-896541.6667*	437066.09679	.041	-1755775.3012	-37308.0322
	6.00	150060.0000	437066.09679	.732	-709173.6345	1009293.6345
	8.00	-2040493.3333*	437066.09679	.000	-2899726.9678	-1181259.6988
8.00	1.00	5389853.3333*	437066.09679	.000	4530619.6988	6249086.9678
	2.00	2713673.3333*	437066.09679	.000	1854439.6988	3572906.9678
	3.00	2461906.6667*	437066.09679	.000	1602673.0322	3321140.3012
	4.00	2199113.3333*	437066.09679	.000	1339879.6988	3058346.9678
	5.00	1143951.6667*	437066.09679	.009	284718.0322	2003185.3012
	6.00	2190553.3333*	437066.09679	.000	1331319.6988	3049786.9678
	7.00	2040493.3333*	437066.09679	.000	1181259.6988	2899726.9678

3. แสดงผลสถิติจำนวนแบคทีเรียโคลิฟอร์มต่อกรัมอุจจาระ

(I) Group		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	438080.0000*	6103.81544	.000	426080.4339	450079.5661
	3.00	432525.0000*	6103.81544	.000	420525.4339	444524.5661
	4.00	433445.0000*	6103.81544	.000	421445.4339	445444.5661
	5.00	436998.3333*	6103.81544	.000	424998.7672	448997.8994
	6.00	429123.3333*	6103.81544	.000	417123.7672	441122.8994
	7.00	431330.0000*	6103.81544	.000	419330.4339	443329.5661
	8.00	434413.3333*	6103.81544	.000	422413.7672	446412.8994
2.00	1.00	-438080.0000*	6103.81544	.000	-450079.5661	-426080.4339
	3.00	-5555.0000	6103.81544	.363	-17554.5661	6444.5661
	4.00	-4635.0000	6103.81544	.448	-16634.5661	7364.5661
	5.00	-1081.6667	6103.81544	.859	-13081.2328	10917.8994
	6.00	-8956.6667	6103.81544	.143	-20956.2328	3042.8994
	7.00	-6750.0000	6103.81544	.269	-18749.5661	5249.5661
	8.00	-3666.6667	6103.81544	.548	-15666.2328	8332.8994
3.00	1.00	-432525.0000*	6103.81544	.000	-444524.5661	-420525.4339
	2.00	5555.0000	6103.81544	.363	-6444.5661	17554.5661
	4.00	920.0000	6103.81544	.880	-11079.5661	12919.5661
	5.00	4473.3333	6103.81544	.464	-7526.2328	16472.8994
	6.00	-3401.6667	6103.81544	.578	-15401.2328	8597.8994
	7.00	-1195.0000	6103.81544	.845	-13194.5661	10804.5661
	8.00	1888.3333	6103.81544	.757	-10111.2328	13887.8994
4.00	1.00	-433445.0000*	6103.81544	.000	-445444.5661	-421445.4339
	2.00	4635.0000	6103.81544	.448	-7364.5661	16634.5661
	3.00	-920.0000	6103.81544	.880	-12919.5661	11079.5661
	5.00	3553.3333	6103.81544	.561	-8446.2328	15552.8994
	6.00	-4321.6667	6103.81544	.479	-16321.2328	7677.8994
	7.00	-2115.0000	6103.81544	.729	-14114.5661	9884.5661
	8.00	968.3333	6103.81544	.874	-11031.2328	12967.8994
5.00	1.00	-436998.3333*	6103.81544	.000	-448997.8994	-424998.7672
	2.00	1081.6667	6103.81544	.859	-10917.8994	13081.2328
	3.00	-4473.3333	6103.81544	.464	-16472.8994	7526.2328
	4.00	-3553.3333	6103.81544	.561	-15552.8994	8446.2328
	6.00	-7875.0000	6103.81544	.198	-19874.5661	4124.5661
	7.00	-5668.3333	6103.81544	.354	-17667.8994	6331.2328
	8.00	-2585.0000	6103.81544	.672	-14584.5661	9414.5661
6.00	1.00	-429123.3333*	6103.81544	.000	-441122.8994	-417123.7672
	2.00	8956.6667	6103.81544	.143	-3042.8994	20956.2328
	3.00	3401.6667	6103.81544	.578	-8597.8994	15401.2328
	4.00	4321.6667	6103.81544	.479	-7677.8994	16321.2328
	5.00	7875.0000	6103.81544	.198	-4124.5661	19874.5661
	7.00	2206.6667	6103.81544	.718	-9792.8994	14206.2328
	8.00	5290.0000	6103.81544	.387	-6709.5661	17289.5661
7.00	1.00	-431330.0000*	6103.81544	.000	-443329.5661	-419330.4339
	2.00	6750.0000	6103.81544	.269	-5249.5661	18749.5661
	3.00	1195.0000	6103.81544	.845	-10804.5661	13194.5661
	4.00	2115.0000	6103.81544	.729	-9884.5661	14114.5661
	5.00	5668.3333	6103.81544	.354	-6331.2328	17667.8994
	6.00	-2206.6667	6103.81544	.718	-14206.2328	9792.8994
	8.00	3083.3333	6103.81544	.614	-8916.2328	15082.8994
8.00	1.00	-434413.3333*	6103.81544	.000	-446412.8994	-422413.7672
	2.00	3666.6667	6103.81544	.548	-8332.8994	15666.2328
	3.00	-1888.3333	6103.81544	.757	-13887.8994	10111.2328
	4.00	-968.3333	6103.81544	.874	-12967.8994	11031.2328
	5.00	2585.0000	6103.81544	.672	-9414.5661	14584.5661
	6.00	-5290.0000	6103.81544	.387	-17289.5661	6709.5661
	7.00	-3083.3333	6103.81544	.614	-15082.8994	8916.2328

4. แสดงผลสถิติจำนวนแบคทีเรีย *Salmonella* sp. ต่อกรัมอุจจาระ

	(I) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	1279.5000*	16.90118	.000	1246.2738	1312.7262
	3.00	1272.8333*	16.90118	.000	1239.6071	1306.0596
	4.00	1289.6667*	16.90118	.000	1256.4404	1322.8929
	5.00	1294.0000*	16.90118	.000	1260.7738	1327.2262
	6.00	1287.1667*	16.90118	.000	1253.9404	1320.3929
	7.00	1274.0000*	16.90118	.000	1240.7738	1307.2262
	8.00	1278.8333*	16.90118	.000	1245.6071	1312.0596
2.00	1.00	-1279.5000*	16.90118	.000	-1312.7262	-1246.2738
	3.00	-6.6667	16.90118	.693	-39.8929	26.5596
	4.00	10.1667	16.90118	.548	-23.0596	43.3929
	5.00	14.5000	16.90118	.391	-18.7262	47.7262
	6.00	7.6667	16.90118	.650	-25.5596	40.8929
	7.00	-5.5000	16.90118	.745	-38.7262	27.7262
	8.00	-.6667	16.90118	.969	-33.8929	32.5596
3.00	1.00	-1272.8333*	16.90118	.000	-1306.0596	-1239.6071
	2.00	6.6667	16.90118	.693	-26.5596	39.8929
	4.00	16.8333	16.90118	.320	-16.3929	50.0596
	5.00	21.1667	16.90118	.211	-12.0596	54.3929
	6.00	14.3333	16.90118	.397	-18.8929	47.5596
	7.00	1.1667	16.90118	.945	-32.0596	34.3929
	8.00	6.0000	16.90118	.723	-27.2262	39.2262
4.00	1.00	-1289.6667*	16.90118	.000	-1322.8929	-1256.4404
	2.00	-10.1667	16.90118	.548	-43.3929	23.0596
	3.00	-16.8333	16.90118	.320	-50.0596	16.3929
	5.00	4.3333	16.90118	.798	-28.8929	37.5596
	6.00	-2.5000	16.90118	.882	-35.7262	30.7262
	7.00	-15.6667	16.90118	.355	-48.8929	17.5596
	8.00	-10.8333	16.90118	.522	-44.0596	22.3929
5.00	1.00	-1294.0000*	16.90118	.000	-1327.2262	-1260.7738
	2.00	-14.5000	16.90118	.391	-47.7262	18.7262
	3.00	-21.1667	16.90118	.211	-54.3929	12.0596
	4.00	-4.3333	16.90118	.798	-37.5596	28.8929
	6.00	-6.8333	16.90118	.686	-40.0596	26.3929
	7.00	-20.0000	16.90118	.237	-53.2262	13.2262
	8.00	-15.1667	16.90118	.370	-48.3929	18.0596
6.00	1.00	-1287.1667*	16.90118	.000	-1320.3929	-1253.9404
	2.00	-7.6667	16.90118	.650	-40.8929	25.5596
	3.00	-14.3333	16.90118	.397	-47.5596	18.8929
	4.00	2.5000	16.90118	.882	-30.7262	35.7262
	5.00	6.8333	16.90118	.686	-26.3929	40.0596
	7.00	-13.1667	16.90118	.436	-46.3929	20.0596
	8.00	-8.3333	16.90118	.622	-41.5596	24.8929
7.00	1.00	-1274.0000*	16.90118	.000	-1307.2262	-1240.7738
	2.00	5.5000	16.90118	.745	-27.7262	38.7262
	3.00	-1.1667	16.90118	.945	-34.3929	32.0596
	4.00	15.6667	16.90118	.355	-17.5596	48.8929
	5.00	20.0000	16.90118	.237	-13.2262	53.2262
	6.00	13.1667	16.90118	.436	-20.0596	46.3929
	8.00	4.8333	16.90118	.775	-28.3929	38.0596
8.00	1.00	-1278.8333*	16.90118	.000	-1312.0596	-1245.6071
	2.00	.6667	16.90118	.969	-32.5596	33.8929
	3.00	-6.0000	16.90118	.723	-39.2262	27.2262
	4.00	10.8333	16.90118	.522	-22.3929	44.0596
	5.00	15.1667	16.90118	.370	-18.0596	48.3929
	6.00	8.3333	16.90118	.622	-24.8929	41.5596
	7.00	-4.8333	16.90118	.775	-38.0596	28.3929

ภาคผนวก ฉ

แสดงผลลำดับเบส

1. ผลการเทียบเคียงลำดับเบสระหว่าง *Lb. reuteri* K16 และ Type strain *Lb. reuteri* DSM20016T

```
K16             -------------------------------------GTGCCTAATACATGCAAGTCGTAC
DSM             AGAGTTTGATNNTGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGTAC
                                                     *************************

K16             GCACTGGCCCAACTGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTG
DSM             GCACTGGCCCAACTGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTG
                ************************************************************

K16             GCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCCGGAGCGGGGGATAACATTTGGAAAC
DSM             GCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCCGGAGCGGGGGATAACATTTGGAAAC
                ************************************************************

K16             AGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCACATGGCTTTTGTTTGAAAGATGGCTTTGG
DSM             AGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCGCATGGCTTTTGTTTGAAAGATGGCTTTGG
                *******************************.****************************

K16             CTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAA
DSM             CTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAA
                ************************************************************

K16             GGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAACTGAGACACGGTC
DSM             GGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAACTGAGACACGGTC
                ************************************************************

K16             CATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG
DSM             CATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG
                ************************************************************

K16             CAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACG
DSM             CAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACG
                ****.********************************************************

K16             TGCGTGAGAGTAACTGTTCACGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTAC
DSM             TGCGTGAGAGTAACTGTTCNCGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTAC
                ******************* ****************************************

K16             GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA
DSM             GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA
                ************************************************************

K16             GCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGC
DSM             GCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGC
                ************************************************************

K16             ATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGG
DSM             ATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGG
                ************************************************************

K16             AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGAC
DSM             AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGAC
                ************************************************************

K16             GCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA
DSM             GCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA
                ************************************************************

K16             AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAA
DSM             AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAA
                ************************************************************

K16             GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
DSM             GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
                ************************************************************

K16             CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
DSM             CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
                ************************************************************

K16             ACATCTTGCGCTAACCTTAGAGATAAGGCGTTCCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTG
DSM             ACATCTTGCGCTAACCTTAGAGATAAGGCGTTNCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTG
                ********************************* ****************************

K16             CATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
DSM             CATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCTGCAACGAGCGCAACC
                ********************************************* ***************
```

```
K16             CATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
DSM             CATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCTGCAACGAGCGCAACC
                ********************************************* **************

K16             CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG
DSM             CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG
                ************************************************************

K16             GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC
DSM             GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC
                ************************************************************

K16             TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGT
DSM             TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGT
                ************************************************************

K16             TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGT
DSM             TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGT
                ************************************************************

K16             TCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC
DSM             TCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC
                ************************************************************

K16             GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAT
DSM             GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAT
                ************************************************************

K16             GGGAGTTTGTAACGCCCAAAGTCGGTGGCCTAACCTTTATGGAGGGAGCCGCCTACGACT
DSM             GGGAGTTTGTAACGCCCAAAGTCGGTGGCCTAACCTTTATGGAGGGAGCCGCCTAAGGCG
                ************************************************************.*.*

K16             TGCATGTA--------------------------------------------------
DSM             GGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAGCCTGCGGCTGGATC
                 *..:*::
```

2. ผลการเทียบเคียงลำดับเบสระหว่าง *Lb. plantarum* P6 และ Type strain *Lb. plantarum* WCFS1

```
P6              AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC
LWCFS1          ----------------------------------------------------CAGTCGAAC
                                                                     .********

P6              GAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGG
LWCFS1          GAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGG
                ************************************************************

P6              TGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAA
LWCFS1          TGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAA
                ************************************************************

P6              TACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTT
LWCFS1          TACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTT
                ************************************************************

P6              TTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTTCACCATGGCAATGA
LWCFS1          TTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACG-GCTCACCATGGCAATGA
                ******************************************   ***************

P6              TACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCC
LWCFS1          TACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCC
                ************************************************************

P6              TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCG
LWCFS1          TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCG
                ************************************************************

P6              CGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAG
LWCFS1          CGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAG
                ************************************************************

P6              AGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
LWCFS1          AGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
                ************************************************************

P6              AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC
LWCFS1          AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC
                ************************************************************

P6              AGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAA
LWCFS1          AGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAA
                ************************************************************


P6              CTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
LWCFS1          CTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
                ************************************************************

P6              GATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGC
LWCFS1          GATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGC
                ************************************************************

P6              TCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGA
LWCFS1          TCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGA
                ************************************************************

P6              ATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCG
LWCFS1          ATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCG
                ************************************************************

P6              CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
LWCFS1          CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
                ************************************************************
```

```
P6              GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTA
LWCFS1          GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTA
                ************************************************************

P6              TGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTG
LWCFS1          TGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTG
                ************************************************************

P6              TCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTAT
LWCFS1          TCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTAT
                ************************************************************

P6              CAAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
LWCFS1          CAG-TTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
                **. ********************************************************

P6              GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG
LWCFS1          GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG
                ************************************************************

P6              TTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
LWCFS1          TTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
                ************************************************************

P6              GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGT
LWCFS1          GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGT
                ************************************************************

P6              TTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAG
LWCFS1          TTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTA---------------------------
                **********************************
```

3. ผลการเทียบเคียงลำดับเบสระหว่าง *Lb. reuteri* P8 และ Type strain *Lb. reuteri* DSM20016T

```
P8              ----------------------------GGGGACGGCGATTGCTATACATGCAAGTCGTAC
DSM             AGAGTTTGATNNTGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGTAC
                                            *  *.*** *:    :*****************

P8              GCACTGGCCCCAACTGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTG
DSM             GCACTGGCCCCAACTGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTG
                ************************************************************

P8              GCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCCGGAGCGGGGGATAACATTTGGAAAC
DSM             GCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCCGGAGCGGGGGATAACATTTGGAAAC
                ************************************************************

P8              AGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCACATGGCTTTTGTTTGAAAGATGGCTTTGG
DSM             AGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCGCATGGCTTTTGTTTGAAAGATGGCTTTGG
                *******************************.****************************

P8              CTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAA
DSM             CTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAA
                ************************************************************

P8              GGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAACTGAGACACGGTC
DSM             GGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAACTGAGACACGGTC
                ************************************************************

P8              CATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG
DSM             CATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG
                ************************************************************

P8              CAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACG
DSM             CAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACG
                ****.********************************************************

P8              TGCGTGAGAGTAACTGTTCACGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTAC
DSM             TGCGTGAGAGTAACTGTTCNCGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTAC
                ******************* ****************************************

P8              GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA
DSM             GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA
                ************************************************************

P8              GCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGC
DSM             GCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGC
                ************************************************************

P8              ATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGG
DSM             ATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGG
                ************************************************************

P8              AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGAC
DSM             AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGAC
                ************************************************************

P8              GCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA
DSM             GCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA
                ************************************************************

P8              AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAA
DSM             AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAA
                ************************************************************
```

```
P8              GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
DSM             GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
                ************************************************************

P8              CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
DSM             CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
                ************************************************************

P8              ACATCTTGCGCTAACCTTAGAGATAAGGCGTTCCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTG
DSM             ACATCTTGCGCTAACCTTAGAGATAAGGCGTTNCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTG
                ********************************* ****************************

P8              CATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
DSM             CATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCTGCAACGAGCGCAACC
                ********************************************* ***************

P8              CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG
DSM             CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG
                ************************************************************

P8              GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC
DSM             GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC
                ************************************************************

P8              TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGT
DSM             TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGT
                ************************************************************

P8              TCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC
DSM             TCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC
                ************************************************************

P8              GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAT
DSM             GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAT
                ************************************************************

P8              GGGAGTTTGTAACGCCCAAAGTCGGTGGCCTAACCTTTATGGAGGGAGCCGCCTAAGGCG
DSM             GGGAGTTTGTAACGCCCAAAGTCGGTGGCCTAACCTTTATGGAGGGAGCCGCCTAAGGCG
                ************************************************************

P8              --ACAGATAACGGT------------------------------------------------
DSM             GGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAGCCTGCGGCTGGATC
                  ******.** *
```

4. ผลการเทียบเคียงลำดับเบสระหว่าง *Lb. paraplantarum* P25 และ Type strain *Lb. paraplantarum* DSM10667T

```
P25             AGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGA
DSM             ----------------AGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGA
                               ********************************************

P25             ACTCTGGTAATGATTGGTGCTTGCATCATGAATTGCATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTG
DSM             ACTCTGGTAATGATTGGTGCTTGCATCATGAATTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTG
                **********************************.*************************

P25             AGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATA
DSM             AGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATA
                ************************************************************

P25             CCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTT
DSM             CCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTT
                ************************************************************

P25             GGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGAGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATAC
DSM             GGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGAGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATAC
                ************************************************************

P25             GTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTAC
DSM             GTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTAC
                ************************************************************

P25             GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGT
DSM             GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGT
                ************************************************************

P25             GAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGT
DSM             GAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGT
                ************************************************************

P25             AACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
DSM             AACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
                ************************************************************

P25             CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGG
DSM             CGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGG
                ************************************************************

P25             CGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTG
DSM             CGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTG
                ************************************************************

P25             GGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
DSM             GGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT
                **.********************************************************

P25             ATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCG
DSM             ATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCG
                ************************************************************

P25             AAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATG
DSM             AAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATG
                ************************************************************
```

```
P25             CTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCT
DSM             CTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCT
                ************************************************************

P25             GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG
DSM             GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTG
                ************************************************************

P25             GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGC
DSM             GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGC
                ************************************************************

P25             AAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCG
DSM             AAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCG
                ************************************************************

P25             TCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAG
DSM             TCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAG
                ************************************************************

P25             TTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
DSM             TTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG
                ************************************************************

P25             GGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATG
DSM             GGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATG
                ************************************************************

P25             GTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGG
DSM             GTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGG
                ************************************************************

P25             ATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATG
DSM             ATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATG
                ************************************************************

P25             CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTA
DSM             CCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTA
                ************************************************************

P25             ACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGAT
DSM             ACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGAT
                ************************************************************

P25             TAGGGTGAAGTCGTAACAAG
DSM             TAGGGTGAAGTCGTAACA--
                ******************
```

5. ผลการเทียบเคียงลำดับเบสระหว่าง *Lb. reuteri* P30 และ Type strain *Lb. reuteri* DSM20016T

```
P30             ---------------------------------------------TACATGCAAGTCGTAC
DSM             AGAGTTTGATNNTGGCTCAGGATGAACGCCGGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGTAC
                                                             ****************

P30             GCACTGGCCCAACTGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGACGATGGATTACCAGTGAGTG
DSM             GCACTGGCCCAACTGATTGATGGTGCTTGCACCTGATTGACGATGGATCACCAGTGAGTG
                ********************************************** ************

P30             GCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCCGGAGCGGGGGATAACATTTGGAAAC
DSM             GCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCCGGAGCGGGGGATAACATTTGGAAAC
                ************************************************************

P30             AGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCACATGGCTTTTGTTTGAAAGATGGCTTTGG
DSM             AGATGCTAATACCGCATAACAACAAAAGCCGCATGGCTTTTGTTTGAAAGATGGCTTTGG
                ********************************.*****************************

P30             CTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAA
DSM             CTATCACTCTGGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAA
                ************************************************************

P30             GGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAACTGAGACACGGTC
DSM             GGCGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGAACTGAGACACGGTC
                ************************************************************

P30             CATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG
DSM             CATACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAG
                ************************************************************

P30             CAACACCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACG
DSM             CAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTGGAGAAGAACG
                ****.********************************************************

P30             TGCGTGAGAGTAACTGTTCACGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTAC
DSM             TGCGTGAGAGTAACTGTTCNCGCAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGTCACGGCTAACTAC
                ****************** ************************************** 

P30             GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA
DSM             GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAA
                ************************************************************

P30             GCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGC
DSM             GCGAGCGCAGGCGGTTGCTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGAAGTGC
                ************************************************************

P30             ATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGG
DSM             ATCGGAAACCGGGCGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGG
                ************************************************************

P30             AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGAC
DSM             AATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGAC
                ************************************************************

P30             GCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA
DSM             GCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA
                ************************************************************

P30             AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAA
DSM             AACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGGAGCTAACGCATTAA
                ************************************************************

P30             GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
DSM             GCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
                ************************************************************
```

```
P30             CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
DSM             CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTG
                ************************************************************

P30             ACATCTTGCGCTAACCTTAGAGATAAGGCGTTCCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTG
DSM             ACATCTTGCGCTAACCTTAGAGATAAGGCGTTNCCTTCGGGGACGCAATGACAGGTGGTG
                ********************************* ****************************

P30             CATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
DSM             CATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCTGCAACGAGCGCAACC
                ********************************************* ***************

P30             CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG
DSM             CTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCG
                ************************************************************

P30             GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC
DSM             GAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC
                ************************************************************

P30             TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGT
DSM             TACAATGGACGGTACAACGAGTCGCAAGCTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGT
                ************************************************************

P30             TCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC
DSM             TCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGC
                ************************************************************

P30             GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAT
DSM             GGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCAT
                ************************************************************

P30             GGGAGTTTGTAACGCCCAAAGTCGGTGGCCTAACCTTTATGGAGGGAGC-----------
DSM             GGGAGTTTGTAACGCCCAAAGTCGGTGGCCTAACCTTTATGGAGGGAGCCGCCTAAGGCG
                *************************************************
```

6. ผลการเทียบเคียงลำดับเบสระหว่าง *Lb. plantarum* P31 และ Type strain *Lb. plantarum* WCFS1

```
P31             AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC
LWCFS1          ----------------------------------------------------CAGTCGAAC
                                                                     .********

P31             GAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGG
LWCFS1          GAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGG
                ************************************************************

P31             TGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAA
LWCFS1          TGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAA
                ************************************************************

P31             TACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTT
LWCFS1          TACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTT
                ********************************** ***************************

P31             TTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTTCACCATGGCAATGA
LWCFS1          TTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCT-CACCATGGCAATGA
                ******************************************* **************

P31             TACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCC
LWCFS1          TACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCC
                ************************************************************

P31             TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCG
LWCFS1          TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCG
                ************************************************************

P31             CGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAG
LWCFS1          CGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAG
                ************************************************************

P31             AGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
LWCFS1          AGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC
                ************************************************************

P31             AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC
LWCFS1          AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC
                ************************************************************

P31             AGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAA
LWCFS1          AGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAA
                ************************************************************

P31             CTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
LWCFS1          CTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
                ************************************************************

P31             GATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGC
LWCFS1          GATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGC
                ************************************************************

P31             TCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGA
LWCFS1          TCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGA
                ************************************************************

P31             ATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCG
LWCFS1          ATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCG
                ************************************************************
```

```
P31             CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
LWCFS1          CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCG
                ************************************************************

P31             GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTA
LWCFS1          GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTA
                ************************************************************

P31             TGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTG
LWCFS1          TGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTG
                ************************************************************

P31             TCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTAT
LWCFS1          TCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTAT
                ************************************************************

P31             CAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG
LWCFS1          CAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG
                ************************************************************

P31             TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
LWCFS1          TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
                ************************************************************

P31             ATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTT
LWCFS1          ATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTT
                ************************************************************

P31             CGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC
LWCFS1          CGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC
                ************************************************************

P31             ATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTT
LWCFS1          ATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTT
                ************************************************************

P31             GTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGAT
LWCFS1          GTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTA----------------------------
                ********************************
```

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ - ชื่อสกุล	นางสาวกาญจนา เรืองยศจันทนา
วันเดือนปี เกิด	20 มิถุนายน 2531
สถานที่เกิด	พิษณุโลก
สถานที่อยู่	88 หมู่ 10 ตำบลวังทอง อำเภอวังทอง จังหวัดพิษณุโลก 65130
ตำแหน่งหน้าที่ การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงาน	Kanjana Rueangyotchanthana, Onanong Pringsulaka, Nuttika Suwannasai, Duangjai Bookusol, Wisrutta Atthakor and Achariya Rangsiruji. (2011). Screening of lactic acid bacteria isolated from fecal origins for multistrains probiotics. The 37th congress on science and technology of Thailand. 10-12 october 2011 at Centara grand and Bangkok convention centre central world, Bangkok, Thailand. (poster presentation)

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2548	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนจุฬาภรณราชวิทยาลัย พิษณุโลก
พ.ศ. 2552	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก
พ.ศ. 2556	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ) จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัดกรุงเทพฯ