ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ศึกษาการอยู่รอดของสปอร์ *Bacillus subtilis* ในกระเพาะและลำไส้จำลอง

(Survival of *Bacillus subtilis* spores in simulated stomach and intestine Condition)

จัดทำโดย

นาย เจษฎา เลิศชัยกิตติไพศาล รหัสนักศึกษา 44040181
นาย กฤษฎากร อิ่มพงษ์ รหัสนักศึกษา 44040750
นาย เอราวัฒน์ นาคคฤทธิ์วงศ์ รหัสนักศึกษา 44040919

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.... 4 / พ.ย. / 2547 อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(ผศ. อดิศร เสวตวิวัฒน์)

2042b

หอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

ศึกษาการอยู่รอดของสปอร์ *Bacillus subtilis* ในกระเพาะและลำไส้จำลอง

(Survival of *Bacillus subtilis* spores in simulated stomach and intestine Conditon)

โดย

1. นายกฤษฎากร อิ่มพงษ์ รหัสนักศึกษา 44040750
2. นายเอราวัฒน์ นาคฤทธิวงค์ รหัสนักศึกษา 44040919
3. นายเจษฎา เลิศชัยกิตติไพศาล รหัสนักศึกษา 44040181

T096844

ปพ.
ก2794
2547
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน...96844...
วัน,เดือน,ปี...- 5 JUN 2009...

กฤษฎากร อิ่มพงษ์ , เจษฎา เลิศชัยกิตติไพศาล และเอราวัฒน์ นาคคฤทธิ์วงศ์ .2547 : ศึกษาการอยู่ของสปอร์ *Bacillus subtilis* ในกระเพาะและลำไส้จำลอง. โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ. อดิศร เศวตวิวัฒน์ :จำนวน 26 หน้า

จากการศึกษาการอยู่รอดของสปอร์ *Bacillus subtilis* ในกระเพาะและลำไส้จำลองโดยเริ่มจากการเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* มา 3 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากอาหาร คือสายพันธุ์เบอร์ 14945,14947และ14948 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร NB เพื่อหาสายพันธุ์สปอร์ที่สร้างสปอร์ได้มากที่สุด จากนั้นนำสายพันธุ์ที่สร้างสปอร์ได้มากดังกล่าว นำสายพันธุ์ที่ได้ดังกล่าวมาทดลองดูการอยู่รอดในกระเพาะจำลองที่ระดับพีเอช 2 ,3 ,7 ,2 ผสม Skimmed milk ซึ่งผลการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อจนสร้างสปอร์ในอาหาร NB พบว่าทุกระดับพีเอชที่นำมาผ่าน ต่อลำไส้จำลองที่ระดับพีเอช 8 โดยการตรวจนับสปอร์ด้วยวิธีการ Pour plate พบว่าที่ระดับพีเอช 2 และพีเอช 3 นั้นหลงเหลือจำนวนสปอร์น้อยในระดับที่ใกล้เคียงกันมาก แต่พบว่าที่ระดับพีเอช 7 และ 2 Skim milk เหลือจำนวนสปอร์มากในระดับที่ใกล้เคียงกัน จึงสรุปได้ว่าในการผลิตอาหารสัตว์โปรไบโอติก ถ้าให้สัตว์กินสปอร์เพียงอย่างเดียวเข้าไปในขณะที่กระเพาะมีพีเอชเป็นกรด (พีเอช 2 หรือ 3) ความเป็นกรดในกระเพาะมีผลทำให้สปอร์ของสายพันธุ์เชื้อ *Bacillus subtilis* ลดลงเหลืออยู่ปริมาณ 3-6 $x10^5$ cfu/ml ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยจนอาจไม่เพียงพอที่จะผ่านไปเจริญต่อในปลายลำไส้เล็กจนถึงลำไส้ใหญ่ได้ แต่ในกระเพาะที่มีพีเอชเป็นกลาง (พีเอช 7) สปอร์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* มีปริมาณการอยู่รอดมากซึ่งให้ผล เช่นเดียวกับกระเพาะจำลองในระดับพีเอช 2 ผสม Ski mmed milk ซึ่งแสดงได้ว่าถ้ามีการให้สัตว์กินอาหารที่ผสมสปอร์ของเชื้อดังกล่าวแทนการกินสปอร์ล้วน อาหารจะช่วยให้การอยู่รอดของสปอร์ผ่านไปจนถึงลำไส้เล็กและลำไส้ให้ได้ในปริมาณมาก แม้ว่าพีเอชในกระเพาะจะอยู่ในระดับพีเอช 2 ก็ตาม ดังนั้นสปอร์ของสายพันธุ์เชื้อ *Bacillus subtilis* จึงเป็นสายพันธุ์หนึ่งที่ดีและเหมาะสมต่อการนำไปผลิตอาหารสัตว์โปรไบโอติกในกลุ่ม *Bacillus subtilis* ต่อไปในอนาคต

เจษฎา
กฤษฎากร
เอราวัฒน์

ลายมือนักศึกษา

ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา

4/11/47

วันเดือนปี

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิชาปัญหาพิเศษในครั้งนี้กว่าจะสำเร็จลุล่วงออกมาได้ต้องประสบปัญหาต่าง ๆ มากมายซึ่งคณะผู้จัดทำต้องใช้ความอดทนต่อสู้ตลอดมาทั้งปัญหาภายในกลุ่มของผู้จัดทำเองและปัญหาจากการทดลองที่พบในขณะทำการทดลอง จึงอยากจะขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยในการให้คำแนะนำและให้การสนับสนุนให้ทุกอย่างผ่านพ้นไปได้ด้วยดีตลอดเวลา

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ทำให้พวกข้าพเจ้ามีกำลังใจและกำลังทรัพย์ตลอดเวลา

ขอขอบคุณ ผศ. อดิศร เศวตวิวัฒน์ ที่ให้คำแนะนำกับกลุ่มข้าพเจ้าที่มีคำถามถามท่านตลอดเวลา โดยที่อาจารย์ก็ให้คำตอบกับพวกเราอย่างไม่รู้สึกเหนื่อยเช่นกัน

ขอขอบคุณกำลังใจจากเพื่อน ๆ ทุกคนที่เจอกัน พี่น้อง พี่เป้ พี่สุ และพี่ๆ ป. โททุกคนที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำตลอดเวลาการทำงาน

และท้ายที่สุดขอขอบคุณ กำลังใจพิเศษจากคนพิเศษที่คอยให้กำลังใจให้มีแรงในการทำงานครั้งนี้โดยไม่รู้สึกเหนื่อยเวลาคิดถึง ขอขอบคุณจริงๆที่มีพวกคุณทุกคน

กฤษฎากร อิ่มพงษ์
เจษฎา เลิศชัยกิตติไพศาล
เอราวัฒน์ นาคคฤทธิ์วงศ์
27 ตุลาคม 2547

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาของปัญหา	1
1.2 ขอบเขตการศึกษา	1
1.3 วัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	
2.1 ประวัติและความเป็นมา	2
2.2 Probiotic คืออะไร	2
2.3 คุณสมบัติ Probiotic	3
2.4 กลไกการทำงานของ Probiotic	6
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์	6
2.6 ปัญหาของ Probiotic	7
2.7 การพัฒนาในอนาคต	8
2.8 กลไกการทำงานที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์	8
2.9 คุณประโยชน์ที่ได้	9
2.10 ลักษณะการทำงานของ Probiotic ที่ดี	10
2.11 หลักการทำงานของ Probiotic ที่ดี	10
2.12 ประโยชน์ของการใช้ Probiotic ผสมอาหารสัตว์	11
2.13 การใช้ร่วมกันระหว่าง Probiotic และยาปฏิชีวนะ	11
2.14 ลักษณะของ *Bacillus subtilis*	13
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	14

	หน้า
3.2 สถานที่ทำการทดลอง	14
3.3 อุปกรณ์	14
3.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์	15
3.5 วิธีการศึกษา	15
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1 การคัดเลือกสายพันธุของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุด	20
4.2 ศึกษาการทนต่อสภาวะจำลองกระเพาะและลำไส้ของสปอร์สายพันธุ์ 14947	21
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	23
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ	26
ภาคผนวก ข สารที่ใช้เตรียมกระเพาะและลำไส้จำลอง	26

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 2.1 แสดงการเปรียบเทียบคุณสมบัติและการออกฤทธิ์ระหว่างโบ่รไบโอติกกับยาปฏิชีวนะ	12
ตาราง 4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุด	20
ตาราง 4.2 ศึกษาการทนต่อสภาวะของกระเพาะและลำไส้ของสายพันธุ์ 14947	21

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 4.1 กราฟการเปรียบเทียบแสดงจำนวนสปอร์ที่อยู่รอด ในสภาวะแตกต่างกัน 22

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันสามารถทดสอบเพื่อหาปริมาณสารเคมีที่ตกค้างในอาหารที่ระดับต่างๆ กันได้ กล่าวคือที่ระดับหนึ่งต่อพันล้านส่วนหรือต่อล้านล้านส่วน ถึงแม้ว่าจะมีเพียงเล็กน้อยแต่ก็สามารถพิสูจน์ให้เห็นถึงอันตรายที่อาจเกิดได้ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นเครื่องเตือนใจสำหรับผู้บริโภค

ความเป็นพิษ, มะเร็ง, ความพิการแต่กำเนิด และการต่อต้านยานั้นล้วนเป็นปัญหาสำคัญที่อาจเกิดขึ้นได้ต่อสาธารณชนเนื่องมาจากการตกค้างของยาและฮอร์โมนในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์, นม และไข่ ในประเทศสวีเดนได้มีการสั่งห้ามอาหารสัตว์ผสมยาปฏิชีวนะ ส่วนประเทศกลุ่มประชาคมร่วมยุโรปได้เพิกถอนการใช้ฮอร์โมนกับเนื้อวัว และได้มีการโต้แย้งเกี่ยวกับ sulfamenthazine ในสหรัฐอเมริกา สิ่งเหล่านี้เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงการตื่นตัวเกี่ยวกับสารเคมีหรือสารเร่งการเจริญเติบโตที่ไม่มีความเป็นธรรมชาติอย่างเพียงพอ

จากการได้ตระหนักถึงในเรื่องนี้ของประชาชนประกอบกับการขยายตัวของมหาวิทยาลัยและการวิจัยทางด้านอุตสาหกรรม ส่งผลให้มีการใช้สารเร่งการเจริญเติบโตที่เป็นธรรมชาติ ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีความหมายหลากหลายด้วยกันแต่เป็นคำจำกัดความของโปรไบโอติกซึ่งใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร

1.2 ขอบเขตการศึกษา

1. ศึกษาเพื่อเปรียบเทียบเชื้อ 3 สายพันธุ์ ในกลุ่ม *Bacillus subtilis* ที่แยกได้จากอาหารสัตว์ของบริษัท ยูเนี่ยนแกสแทป จำกัดโดยเลือกเชื้อในกลุ่มที่สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุดในสภาวะที่กำหนด
2. ศึกษาการอยู่รอดของสปอร์เชื้อสายพันธุ์ที่ผลิตสปอร์มากที่สุดในกระเพาะและลำไส้เทียมที่ระดับพีเอชต่างๆ กัน โดยเปรียบเทียบกับพีเอช 2 Skimmed milk

1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อเลือกสายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้วของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุดโดยจะนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกที่ประโยชน์สูงสุด ในด้านอุตสาหกรรมอาหารสัตว์
2. เพื่อศึกษาการทนต่อสภาวะของกระเพาะเทียมที่ระดับพีเอชต่าง ๆ และลำไส้จำลองเพื่อดูความเป็นไปได้ของสายพันธุ์ *Bacillus subtilis* ที่คัดเลือกต่อเพื่อนำไปผลิตเป็นโปไบโอติก

บทที่ 2 ตรวจเอกสาร

2.1 ประวัติและความเป็นมา

ความจริงในวงการสัตวแพทย์ได้เรียนรู้ถึงปัญหาของการขาดจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ก่อโรคและทำประโยชน์ให้แก่สัตว์มานานแล้ว โดยเฉพาะในการอนุบาลลูกโคแรกเกิดที่มีปัญหาในการที่ไม่สามารถย่อยอาหารและนมได้ดี และในการบำบัดรักษาโรคท้องเสียในลูกโคโดยการให้กินอุจจาระของโคแม่หรือกากอาหารในกระเพาะส่วนรูเมน เพื่อควบคุมกลุ่มอาการที่กล่าวมาแล้วและได้ถือปฏิบัติกันตลอดมา แต่ก็ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ชนิดใดพวกใดเป็นตัวสำคัญ มีการทดลองเลี้ยงสุกรและไก่ในประเทศแถบสแกนดิเนเวีย โดยการนำเอากากอุจจาระตากแห้งผสมกับอาหารให้ไก่และสุกรกิน พบว่าการเจริญเติบโตทั้งในไก่และสุกรฝูงที่ทำการทดลองให้ผลในการเร่งการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น และลดอัตราการเกิดโรคท้องเสียได้อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับในประเทศแถบยุโรปกลางได้พบว่าจุลินทรีย์พวกที่สร้างกรดแลคติค สามารถที่จะทำให้สภาวะของลำไส้คนเกิดการสมดุล เป็นที่มาของการผลิตนมเปรี้ยวอย่างแพร่หลาย ในปัจจุบันนี้นักวิชาการจึงสรุปว่าพวกจุลินทรีย์กลุ่มที่สร้างกรดแลคติค เป็นตัวการสำคัญในการออกฤทธิ์สร้างสมดุลในลำไส้ของคนและสัตว์ จึงมีการศึกษาค้นคว้าและทำการทดลองทำให้ได้มาซึ่งสารที่เราเรียกว่า ตัวเสริมชีวนะ (Probiotics)

2.2 Probiotics คืออะไร

Probiotics คือ จุลินทรีย์ที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้เสริมในอาหารสัตว์เพื่อปรับจำนวนจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารให้อยู่ในสมดุลที่เหมาะสม เสริมสร้างการทำงานในระบบทางเดินอาหาร การย่อยและกลไกต่างๆ ในการใช้อาหารของสัตว์ให้ดีขึ้น จุลินทรีย์เหล่านี้มักมีอยู่ในระบบย่อยอาหารปกติเป็นเชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์และสิ่งมีชีวิต

คำจำกัดความนี้ ปรับปรุงมาจากของเดิมซึ่งกล่าวว่า สารเสริมชีวนะ คือ จุลินทรีย์หรือสารซึ่งรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ เนื่องจากคำว่า สาร อาจทำให้เข้าใจผิดถึงสารปฏิชีวนะ ซึ่งจุลินทรีย์สร้างขึ้นเช่นกัน มาในปัจจุบันผลิตภัณฑ์เสริมชีวนะใหม่ๆ นอกจากจะประกอบด้วยจุลินทรีย์แล้ว ยังมีสารซึ่งได้จากการหมักนอกตัวสัตว์ของจุลินทรีย์พวกเดียวกันนี้ผสมอยู่ด้วย ดังนั้น คำจำกัดความอาจเปลี่ยนได้ตามความก้าวหน้าของวิทยาการในด้านนี้ในอนาคต

2.3 คุณสมบัติของ Probiotics (สถาพร ดิเรกบุษราคม . 2543. ฉบับ ที่ 4 ปีที่ 1 เดือน 2543 .)

Probiotics ที่ดีควรประกอบด้วยคุณสมบัติดังต่อไปนี้

1. เป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่ทำให้เกิดโรค (non pathogenic bacteria) โดยผ่านการตรวจสอบจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและย เรวมทั้งหน่วยงานที่เกี่ยวข้องอื่นๆ โดยเฉพาะสถาบัน General Recognised As Safe (GRAS) ซึ่งมีจุลินทรีย์น้อยมากที่ได้รับการรับรอง
2. ควรเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก (gram positive) เนื่องจากสามารถทนทานต่อการย่อยของน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารได้ดีกว่าเพราะมีผนังเซลล์หนาประมาณ 20 – 80 นาโนเมตร ซึ่งหนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ
3. ควรจะทนกรดได้ดี เพื่อให้สามารถเดินทางผ่านกระเพาะอาหารซึ่งมีสภาวะความเป็นกรดสูงได้
4. ควรจะสามารถสร้างกรดได้ดี เพื่อช่วยปรับสภาวะในระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์พวกโคลิฟอร์ม เช่น กรดแลคติค
5. เจริญเติบโตได้ง่ายและสามารถเติบโตได้ในอาณาบริเวณที่มีแหล่งอาหารน้อย
6. เพิ่มจำนวนได้เร็วคือมีค่า Generation time สูง และมีความสามารถในการยังชีพอยู่ได้ในลำไส้สัตว์
7. ควรจะเป็นตัวยับยั้งที่ดี ซึ่งแบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างสารแอนตี้ – อี โคไลแฟคเตอร์ (anti *E.coli* factor) ได้มากเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออีโคไล
8. เป็นสายพันธุ์ที่ให้คุณแก่สัตว์ เช่น เพิ่มการเจริญเติบโต การต้านทานโรค กล่าวคือมันช่วยย่อยสลายกากอาหารให้ผลผลิต กรดอะมิโน กรดไขมัน และวิตามิน เป็นต้น
9. มีความคงตัวและอยู่ได้นานทั้งต่อการเก็บรักษาและใช้งานจริง
10. สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้หลายชนิดที่มักจะพบหรือใช้ในการผสมอาหาร
11. ไม่มีคุณสมบัติในการถ่ายทอดกรรมพันธุ์การต้านยา
12. ไม่ก่อให้เกิดหรือสร้างสารพิษซึ่งสามารถตกค้างในเนื้อสัตว์ได้
13. สร้างสารปฏิชีวนะ (Bacteriocin)
14. ต้องมีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง คือ ระหว่าง 20 – 60 องศาเซลเซียส

วิธีใช้ ในการใช้ probiotics มีข้อควรคำนึงดังต่อไปนี้

1. เลือกสายพันธุ์ให้เหมาะกับชนิดของสัตว์ที่จะใช้
2. ใช้ให้เหมาะกับอายุหรือระยะของสัตว์
3. ตรวจคุณภาพของเชื้อก่อนใช้ ชนิดถูกต้อง เชื้อมีชีวิตทั้งก่อนผสมและหลังผสมอาหาร
4. ป้องกันการเสื่อมของเชื้อโดยการเคลือบ (encapsulated)
5. ให้กินตามขนาดที่แนะนำและให้โดยต่อเนื่อง เพื่อให้มีจำนวนเชื้อเพียงพอในลำไส้ส่วนกลาง
6. ระวังการใช้ร่วมกับสารปฏิชีวนะ
7. อาหาร สภาพแวดล้อม และสภาวะของสัตว์ มีผลต่อประสิทธิภาพของสารเสริมชีวนะ

เนื่องจาก probiotics เป็นผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ข้อสังเกตในการใช้มีดังนี้

1. ควรมีการตรวจสอบเชื้อก่อนใช้ ทั้งชนิด และความมีชีวิต
2. วันล่วงอายุของผลิตภัณฑ์ซึ่งโดยทั่วไปมักกำหนดไว้ 1 ปี จากวันผลิต จะสั้นลงเนื่องจากการขนส่ง
3. ความคงทนของจุลินทรีย์ต่อสภาพอากาศซึ่งร้อนชื้น และรังสีจากดวงอาทิตย์ มีผลต่อจำนวนสิ่งมีชีวิต
4. ส่วนประกอบของอาหาร การผสมและการอัดเม็ดทำให้ความมีชีวิตสั้นลงปกติควรใช้ใน 3 เดือน หลังผสม
5. สภาพของฟาร์มและสัตว์เลี้ยง ถ้ามีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูง จะไม่ช่วยให้ดีขึ้น probiotics ไม่ใช่ยารักษาโรค
6. วิธีใช้ต้องถูกต้องตามลักษณะของผลิตภัณฑ์
7. การใช้ยาปฏิชีวนะในฟาร์ม
8. ควรมีการทำการทดลองในสภาพฟาร์มในประเทศ เพื่อความมั่นใจในผลการใช้ และเพื่อหาข้อสรุปในการใช้

จุลินทรีย์ที่ได้รับการคัดเลือกทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย เมื่อนำมาเติมในอาหารสัตว์ อาจใช้เพียงชนิดเดียว หรือใช่ร่วมกันหลายชนิดระหว่างแบคทีเรียด้วยกันหรือระหว่างแบคทีเรียกับเชื้อรา ไม่ว่าจะใช้แบบใด ผลที่ได้จากการใช้ที่ปรากฏและวัดได้อาจสรุปได้ดังนี้ (ศุภชัย บุญนำมา และคณะ 2543)

1. <u>ด้านอาหารสัตว์</u>
   1.1 เร่งการเจริญเติบโต มีผลเหมือนการใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีสังเคราะห์ คือ ทำให้การเพิ่มน้ำหนัก อัตราการไข่ และขนาดฟองไข่ การให้นม ดีขึ้น
   1.2 เพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีขึ้น เพิ่มอัตราการหมักและการย่อยอาหาร

2. <u>ด้านสุขภาพสัตว์</u>
   2.1 ลดอัตราป่วยและตายของลูกสัตว์จากท้องร่วง
   2.2 ลดอาการท้องผูกในสัตว์
   2.3 เพิ่มความต้านทานโรคในสัตว์ สัตว์มีสุขภาพดีขึ้น

3. <u>ด้านสิ่งแวดล้อม</u>
   3.1 จุลินทรีย์พวกนี้หมดสภาพในสิ่งปลดปล่อย จึงไม่ตกค้างในน้ำทิ้ง มูล และวัสดุรองพื้นคอก
   3.2 ไม่คงตัวในธรรมชาติ ไม่พบอยู่ในดิน จึงไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์และพืชทั่วไป รวมทั้งสัตว์น้ำและพืชน้ำ

เมื่อสัตว์กิน probiotics เข้าสู่ร่างกาย จุลินทรีย์จะทำงานโดยต่อต้านกลุ่มของแบคทีเรียเดิมในลำไส้บางกลุ่มโดยตรง มีผลให้เกิดความสมดุลของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์และที่มีโทษในร่างกาย ซึ่งมีผลต่อการใช้อาหาร หรือกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ดังนี้

1. ลดจำนวนแบคทีเรียบางกลุ่มในลำไส้ โดย
   1.1 ผลิตสารต่อต้านเชื้อ เช่น กรดอินทรีย์ ทำให้ pH ต่ำลง แบคทีเรียที่มีโทษอยู่ไม่ได้
   1.2 แย่งอาหาร ทำให้แบคทีเรียที่มีโทษขาดอาหาร ลดจำนวนลง
   1.3 แย่งที่เกาะบนผิวลำไส้ ทำให้แบคทีเรียที่มีโทษถูกขับออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น
2. เปลี่ยนแปลงการใช้อาหาร
   2.1 เป็นแหล่งอาหารและไวตามินบางชนิด
   2.2 เพิ่ม / ลดการทำงานของเอนไซม์
3. กระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค
   3.1 เพิ่มระดับแอนตี้บอดี้
   3.2 เพิ่มการทำงานของตัวกินเชื้อแบคทีเรีย (Macrophage)

2.4 กลไกการทำงานของ probiotics

เมื่อสัตว์ได้รับ probiotics เข้าสู่ร่างกาย probiotics จะผ่านกระเพาะเข้าไปเจริญเติบโตหรือเกาะติดกับผนังลำไส้เล็กทุกส่วนโดยเฉพาะการแทรกตัวอยู่ตามร่อง villi ของลำไส้ มีการย่อยสลายกากอาหารแล้วสร้างกรดแลคติค กรดแลคติคจะทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค การเกาะติดของมันจะแผ่กระจายทุกพื้นที่ทำให้ปิดทางหรือการเกาะติดของจุลินทรีย์พวกที่ทำให้เกิดโรค เช่น แบคทีเรีย และไวรัส การที่มันเป็นตัวแปลกปลอมจะดึงดูดให้พวกแมคโครฟาร์จ (macrophage)เดินทางมามาก สามารถที่จะช่วยให้ร่างกายสร้างสิ่งเร้าต่อต้าน (Antibody) จึงเป็นการกระตุ้นให้มีระบบภูมิคุ้มกันเฉพาะแห่ง (Local immunity) ได้ดีขึ้น นอกจากนี้มันยังมีความสามารถในการผลิตสารซึ่งจำเป็นต่อสัตว์ เช่น กรดไขมัน กรดอะมิโน และวิตามิน วิธีการที่นอกจากจะผลิตกรดแลคติคและป้องกันการเกาะติดของเชื้อโรคแล้ว มันยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะอ่อนๆ (Bacteriocin) ในการทำลายจุลินทรีย์พวกที่ทำให้เกิดโรคอีกด้วย ซึ่งเป็นการทำงานของ probiotics ทั่วไปอย่างกว้างๆ

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์

ผลของกระบวนการอัดเม็ด

ผลิตภัณฑ์ probiotics ที่ใช้เป็นอาหารสัตว์โดยตรงประกอบด้วยจำนวนจุลินทรีย์สปีชีส์ที่รวมทั้ง Lactobacillus (*L. acidophilus*), streptococcus (*S. faecium*), bacillus (*B. subtilis*) และยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ปริมาณของจุลินทรีย์เหล่านี้จะมีมากน้อยเพียงใดย่อมขึ้นอยู่กับความสามารถทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันออกไป Lactobacillus เป็นจุลินทรีย์พวกที่อ่อนแอซึ่งไม่สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเป็นอย่างยิ่ง อย่างเช่น ความร้อนและแรงกดดันจากกระบวนการอัดเม็ด ในทางตรงกันข้าม bacilli นั้นเป็นจุลินทรีย์พวกที่มีความเสถียรเป็นอย่างมากซึ่งสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในกระบวนการอัดเม็ด เนื่องมาจากความสามารถในการสร้างสปอร์ที่มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ความดัน และความชื้นได้ ยีสต์และ streptococci มีความสามารถในการรอดชีวิตอยู่ได้ในระหว่าง พวก lactobacilli และพวก bacilli

จากการสำรวจของมหาวิทยาลัยของ Nebraska เพื่อวิเคราะห์หาผลของการอัดเม็ดที่มีต่อการมีชีวิตรอดและความเสถียรของ probiotics พบว่า ในการทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดของ lactobacillus, streptococcus, bacillus และยีสต์ที่ช่วงอุณหภูมิต่างๆกัน มี 2 การทดลองได้ชี้ให้เห็น กล่าวคือในการทดลองครั้งแรก นักวิจัยจะใช้อาหารสุกรที่ประกอบด้วยข้าวโพด, ถั่วเหลือง และไขสัตว์ 4 % การรอดชีวิตของจุลินทรีย์พวก probiotics ในการวิจัยที่ Nebraska จะถูก

ตัดสินโดยกิจกรรมของมัน โดยทั่วไปจะแสดงในรูปของ log 10 counts สำหรับทุกๆหน่วยที่ลดลงใน log 10 counts ซึ่งมีกานลดลง 10 กลุ่ม หรือมีจำนวนเซลล์ที่แท้จริงอยู่ 90 % ตัวอย่างเช่น การลดลงใน 10 วงจร log จาก 6 ไป 5 เป็นการลดเพียง 16.7 % แต่จะเทียบได้กับการลดลงของจำนวนเซลล์ที่แท้จริงจาก 1,000,000 ไป 100,000 หรือลดลง 90 %

ในการทดลองครั้งที่ 1 นั้น Bacillus จะถูกพบว่ามีความทนทานต่อกระบวนการอัดเม็ดมากที่สุด มีเพียงจำนวนน้อยที่สูญเสียไปเนื่องจากการตาย ซึ่งมีการสังเกตหลังจากการอัดเม็ดที่อุณหภูมิ 52 องศา ถึง 102 องศา ยิ่งไปกว่านี้ อาหารที่บรรจุ Bacillus และถูกอัดเม็ดที่อุณหภูมิ 102 องศา จะถูกนำมาทดสอบความเสถียรเป็นเวลามากกว่า 8 สัปดาห์ จุลินทรีย์กลุ่ม Bacillus ในอาหารนี้ยังคงความเสถียรและมีชีวิตอยู่ได้โดยมีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยใน log 10 counts ระหว่าง 2 เดือนของการเก็บรักษา อย่างไรก็ตาม ยีสต์ที่ถูกอัดเม็ดในระหว่างการทดลองที่ 1 จะมีการตายขึ้น ตัวอย่างเช่น ที่อุณหภูมิ 72 องศา ยีสต์จะสูญเสียไป 10 % ใน log 10 counts ซึ่งแสดงว่า จะมีการลดลง 99.97 % ของปริมาณยีสต์ที่ยังคงมีชีวิตอยู่

2.6 ปัญหาของโปรไบโอติก

ในแง่ความเป็นจริง เราไม่สามารถที่จะหาโปรไบโอติกที่มีคุณสมบัติเพียบพร้อมได้อย่างในอุดมคติ ทั้งนี้เนื่องมาจากคุณสมบัติเฉพาะตัวของมัน โปรไบโอติกบางชนิดไม่สามารถทนต่อความร้อนได้ โดยเฉพาะความร้อนที่เกิดจากกระบวนการอัดเม็ด (pelleting) ได้ แต่อย่างไรก็ตาม ความก้าวหน้าทางวิชาการทำให้สามารถเพิ่มขีดจำกัดในสิ่งต่าง ๆ เหล่านี้ได้ เช่น การเคลือบ (coated) เพื่อให้โปรไบโอติกสามารถเข้าสู่ลำไส้ได้ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มันจะทำงานได้ดีที่สุด

ในเรื่องของประสิทธิภาพการทำงานของโปรไบโอติกนั้น ได้ปรากฏว่ายังมีการถกเถียงกันอยู่บ้างถึงผลตอบสนองที่เกิดจากการใช้ทั้งในประเทศและต่างประเทศ เกษตรกรบางรายใช้ไม่ได้ผลในขณะที่บางรายใช้ได้ผล อีกทั้งไม่แน่ใจว่าผลตอบแทนที่ได้นั้นจะคุ้มกับการลงทุนที่เพิ่มขึ้นหรือไม่ ผลแตกต่างเหล่านี้เกิดขึ้นจากการใช้โปรไบโอติกในระยะเวลาที่ไม่เหมาะสม โปรไบโอติกนี้จะใช้ได้ผลดีในสภาวะที่สัตว์เกิดความเครียด เนื่องจากปัจจัยต่างๆ ทั้งนี้เพราะว่าในสภาพปกตินั้น จุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารทั้งชนิดที่เป็นโทษและที่เป็นประโยชน์อยู่ในสภาวะสมดุล แต่ถ้าหากสัตว์เกิดความเครียดขึ้นเมื่อใดสภาวะสมดุลของจุลินทรีย์เหล่านี้จะเสียไป โดยจุลินทรีย์ที่เป็นโทษจะเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์จะมีปริมาณลดลง โดยเฉพาะพวก *E. coli* จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นมาก ทำให้สัตว์แสดงอาการท้องเสีย เจริญเติบโตช้าและอ่อนแอ เป็นต้น แต่เมื่อเสริมโปรไบโอติกแล้วจะช่วยปรับสภาพสมดุลของจุลินทรีย์ให้กลับสู่ปกติ สภาวะที่ใช้โปรไบโอติกได้ผลดี จากการสรุปของ ศุภชัย บุญนำมา และคณะ . 2543 .ได้แก่

- ช่วงหย่านมสัตว์
- ช่วงเปลี่ยนคอกหรือเคลื่อนย้ายสัตว์
- ช่วงที่อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลัน
- ช่วงเปลี่ยนอาหาร
- เมื่อสัตว์ถูกเลี้ยงในสภาพแออัด
- ภายหลังจากที่มีการใช้สารปฏิชีวนะเป็นระยะเวลานาน โปรไบโอติกจะช่วยปรับสภาวะของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น

2.7 การพัฒนาในอนาคต

โปรไบโอติก ยังใหม่สำหรับวงการอาหารสัตว์ทั้งในและต่างประเทศ ข้อมูลบางประการ เช่น การทำงานของเชื้อ ยังไม่มีคำอธิบายที่ชัดเจน และยังมีความพยายามที่จะหาสายพันธุ์ที่จะมีประสิทธิภาพที่จะช่วยเพิ่มมูลค่าการผลิตสัตว์ให้ดีขึ้น ผลการศึกษาค้นคว้าทั้งในด้านการเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต การให้ผลด้านสุขภาพ แสดงว่าโปรไบโอติกให้ผลดีทั้งสองด้าน แต่มักไม่แสดงความแตกต่างที่ชัดเจนทางสถิติ การทดลองภาคสนามในแนวกว้างที่มีการวางแผนถูกต้องตามกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ยังมีจำกัด อย่างไรก็ตาม มีการพยายามใช้โปรไบโอติกในอาหารสัตว์ทำให้ไม่มีสารตกค้างในผลิตภัณฑ์และไม่ปนเปื้อนสิ่งแวดล้อม

2.8 กลไกการทำงานที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ (ศุภชัย บุญนำมา และคณะ 2543)

1. มีรายงานถึงผลที่ได้จากการเสริมแบคทีเรียแลคติคในอาหารสัตว์ที่แสดงว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ซึ่งสามารถนำสารอาหารไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพขึ้น ดังต่อไปนี้ คือ

- สามารถควบคุมการสังเคราะห์สารพิษประเภท Amines ภายในลำไส้เล็ก โดยมีการทดลองใช้ *L. acidophilus* เพื่อลดการทำงานของเอนไซม์ deaminase ภายในลำไส้เล็กซึ่งจะช่วยลดการท้องเสียในสัตว์ได้
- สามารถปลดปล่อยกรดอะมิโนไลซีนในระหว่างการเจริญเติบโตในทางเดินอาหาร โดยมีการทดลองใช้ *L. fermentum* เสริมในอาหารสุกรโปรตีนต่ำ ผลปรากฏว่า สุกรกลุ่มที่ได้รับการเสริมด้วย probiotics ซึ่งสามารถผลิตไลซีนได้มีน้ำหนักมากกว่า

2. แบคทีเรียแลคติคสามารถสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติค กรดอะซิติค และสารประกอบจากกระบวนการเมตาโบไลท์ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคได้

3. แบคทีเรียแลคติคสามารถสร้าง Bacteriocin ที่เป็นสารประกอบเปปไทด์ เช่น ไนซิน ไดโพคอกซิน และริวทีริน เป็นต้น ซึ่งมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ และสามารถใช้แทนยาปฏิชีวนะได้ จึงทำให้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคไม่เกิดการดื้อยา นอกจากนี้สารเหล่านี้สามารถย่อยสลายได้โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีน เช่น ทริปซิน แพนครีเอทิน เอนไซม์จากน้ำลายและกระเพาะอาหารจึงไม่ทำให้เกิดการดื้อยา

สำหรับโปรไบโอติกที่มีชื่อทางการค้าว่า โตโยเซอริน ซึ่งประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ Bacillus toyoi จำนวน 1 x 10^9 สปอร์/กรัม ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสปอร์ ไม่เป็นโทษ ไม่ก่อให้เกิดโรค สามารถอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารสัตว์ได้ชั่วคราว หลังจากอยู่ในลำไส้ระยะเวลาหนึ่งก็จะถูกขับออกมากับอุจจาระ ไม่ถูกทำลายโดยน้ำย่อยในกระเพาะซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรด เมื่อเข้าสู่ลำไส้สปอร์จะแตกตัวเป็นแบคทีเรียมีชีวิต

2.9 คุณประโยชน์ที่ได้

จากการสรุปของ ศุภชัย บุญนำมา และคณะ 2543 ได้สรุปคุณประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกดังนี้

1. เมื่อใช้เสริมในอาหารพ่อแม่ไก่พันธุ์เนื้อพบว่า
   - จำนวนของไข่ที่มีขนาดใหญ่เพิ่มขึ้น
   - เปอร์เซนต์ไข่ที่นำฟักเข้าเพิ่มขึ้น แต่ทำให้เปอร์เซนต์ไข่ที่ไม่ได้มาตรฐานในการนำเข้าฟักลดลง
   - จำนวนลูกไก่ที่ฟักออกทั้งหมดต่อฝูงและจำนวนลูกไก่ที่ได้ต่อแม่ไก่เพิ่มขึ้น
   - สุขภาพของไก่ดีขึ้น และอัตราการตายลดลง เนื่องจาก probiotics ไปกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันโรคชนิดไม่จำเพาะโรค (non-specific immunity) ให้สูงขึ้น และในขณะเดียวกันจะควบคุมหรือลดจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ (anti-infectious) ลง

2. มีรายงานว่า การให้หนูไมซ์กิน *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus delbruccki subsp. Bulgaricus* จะทำให้การตอบสนองในการสร้างภูมิคุ้มกันทั้งในเซลล์และในของเหลวเพิ่มขึ้น

3. เมื่อใช้เสริมในอาหารสุกร พบว่า
   - อัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น

- ลดอัตราการขี้ไหลของลูกสุกรหย่านมลงได้ในทุกระดับของการเสริม
- ประสิทธิภาพการใช้อาหารเพิ่มขึ้น
- น้ำหนักเพิ่มขึ้น

2.10 ลักษณะการทำงานของโปรไบโอติกที่ดี

1. เป็นสายพันธุ์ที่ให้ประโยชน์ทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตมากขึ้นและมีความต้านทานต่อโรคดีขึ้น
2. ไม่ทำให้เกิดโรคและไม่เป็นพิษ (non-pathogenic,non-toxic)
3. เป็นเซลล์ที่มีชีวิตและมีจำนวนมากพอควรที่จะเดินทางไปจนถึงทางเดินอาหารส่วนท้ายได้
4. ทนต่อสภาพกรดในกระเพาะและน้ำดีในลำไส้ แต่สามารถย่อยสลายในลำไส้ได้ดี
5. มีความคงตัวและมีชีวิตอยู่ได้นานในสภาพเก็บรักษาและการใช้งานจริงในฟาร์ม
6. มีความคงตัวและมีชีวิตอยู่ได้นานในการผสมอาหารสัตว์ เนื่องจากการผลิตอาหารสัตว์บางชนิดต้องผ่านกระบวนการความร้อน แรงอัดเพื่อการอัดเม็ด และสภาพเป็นกรด หรือการ extrusion และ oxidation เช่น วัตถุที่เติมในอาหารสัตว์บางชนิดซึ่งช่วยในการถนอมคุณภาพอาหารสัตว์
7. ไม่ตกค้างในซากสัตว์
8. ราคาไม่แพง
9. ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร
10. ไม่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม
11. ไม่ทำให้เกิดการแพ้
12. เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตจำนวนมากในระดับอุตสาหกรรมได้

2.11 หลักการทำงานของโปรไบโอติกที่ดี

1. ลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค โดย
   - สร้างสาร Antibacterial substance
   - ขัดขวางเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค
   - สามารถจับกับผนังของลำไส้ ทำให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคไม่สามารถเกาะ และก่อตัวในทางเดินอาหาร
2. ช่วยระบบย่อยอาหาร โดย
   - สร้าง Lactic acid ทำให้กระเพาะมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น การย่อยอาหารดีขึ้น

20426

- สร้าง Beta-galactosidase ทำให้การใช้น้ำตาลกาแลคโตสในน้ำนมดีขึ้น
- สร้างน้ำย่อย เช่น Pectinase, Cellulase
- ลดพิษของ amine และ แอมโมเนีย

3. กระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค โดย
- มีการสร้างสารแอนติบอดี้มากขึ้น
- เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ Macrophage ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งทำหน้าที่กินจุลินทรีย์ที่ทำให้ เกิดโรคหรือสารแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย

2.12 ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกผสมอาหารสัตว์ (วรพจน์ สุนทรสุข และเกวลี จันทร์พันธุ์ . 2545.)

1. ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตแทนยาปฏิชีวนะและเคมีภัณฑ์ซึ่งอาจจะพบปัญหาการดื้อยาและสารตกค้าง
2. ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารในสัตว์ดีขึ้นทำให้การใช้น้ำตาลแลคโตสในบบเดีขึ้น
3. ใช้ป้องกันโรคต่างๆเนื่องจากโปรไบโอติกทำให้สัตว์มีภูมิคุ้มกันสูงขึ้น บดการเกิดโรคท้องเสียในสัตว์เมื่อสัตว์เกิดความเครียดจะมีผลทำให้สูญเสียสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้
4. ยับยั้งหรือป้องกันการเกิดเนื้องอกโดยโปรไบโอติกจะช่วยยับยั้งการสร้างเซลล์เนื้องอกและลดการสร้างน้ำย่อยที่ใช้ในการสร้างสารไนโตรซามิน
5. ยับยั้งการสร้างคลอเรสเตอรอล
6. ใช้ได้กับสัตว์ทุกชนิด ทุกระยะ (ยกเว้นเป็ด เนื่องจากไม่มีข้อแนะนำให้ใช้สำหรับเป็ด)
7. FDA ยอมรับว่าเป็น GRAS (Geneally Recognized as Safe)

2.13 การใช้ร่วมกันระหว่างโปรไบโอติกและยาปฏิชีวนะ

โดยหลักการแล้วไม่ควรใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับโปรไบโอติกเพราะยาปฏิชีวนะอาจทำลายโปรไบโอติก แต่ถ้ามีความจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันหรือรักษาโรคเนื่องจากสัตว์ป่วยหรือเกิดโรคระบาดจะต้องทำการทดสอยปฏิกิริยาของโปรไบโอติกกับฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดเพื่อไม่ให้ยาปฏิชีวนะทำลายโปรไบโอติกและจุลชีพในระบบทางเดินอาหารที่มีอยู่ตามธรรมชาติ (Normal flore) ของร่างกาย ดังนั้นการเติมโปรไบโอติกในอาหารสัตว์ควรให้สัตว์ได้รับจุลชีพที่เหมาะสมเข้าไปด้วย จะทำให้ร่างกายสัตว์ฟื้นคืนสู่สภาพปกติได้รวดเร็วขึ้น มีผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกหลายชนิด ที่มีส่วนประกอบของจุลินทรีย์หลายตัวรวมกันซึ่งสามารถใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะบางตัวได้ เนื่องจากไม่มีการออกฤทธิ์ขัดขวางหรือทำลายซึ่ง

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยี...
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า...

กันและกัน ดังนั้นการเลือกใช้โปรไบโอติกร่วมกับยาปฏิชีวนะจึงควรพิจารณาข้อบ่งใช้ให้ถี่ถ้วนซึ่งจะพบคุณสมบัติที่แตกต่างกันระหว่างโปรไบโอติกและยาปฏิชีวนะดังพอสรุปได้

ตาราง 2.1 แสดงการเปรียบเทียบคุณสมบัติและการออกฤทธิ์ระหว่างโปรไบโอติกกับยาปฏิชีวนะ

โปรไบโอติก	ยาปฏิชีวนะ
คุณสมบัติ 1. เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต 2. ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร 3. ส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร 4. ไม่มีสารตกค้างในอวัยวะต่างๆ 5. ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุ์กรรมของจุลินทรีย์	คุณสมบัติ 1. เป็นสารประกอบเคมีบริสุทธิ์ 2. ดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร 3. ส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร 4. อาจมีสารตกค้างในอวัยวะต่างๆ 5. อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุ์กรรมของจุลินทรีย์
การออกฤทธิ์ 1. สร้างกรดและลด pH ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค 2. ทำงานเจาะจงเฉพาะที่ 3. แบ่งตัวเพิ่มาจำนวนได้ในระบบทางเดินอาหารและแย่งจับพื้นที่ทางเดินอาหารกับจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค	การออกฤทธิ์ 1. ยับยั้งการสร้างโปรตีน DNA, RNA ของเซลล์มีชีวิต 2. มีการทำงานกว้างขวาง 3. ไม่มีการเพิ่มจำนวน

ที่มา (Kloepper และคณะ ,1980)

2.14 ลักษณะของ *Bacillus subtilis*

Bacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ลักษณะรูปร่างเป็นท่อนขนาด 0.3x 2.2 ไมโครเมตร ถึง 1.2 x 7.0 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้ด้วยการใช้แฟลกเจลลา *Bacillus* สามารถสร้างสปอร์ภายใน

เซลล์เรียกว่าเอนโดสปอร์ เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะขาดแคลนอาหารหรือสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม เอนโดสปอร์มีรูปร่างแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ เช่นกลม รี หรือ ทรงกระบอก และฝังตัวอยู่กลางเซลล์หรือด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ เอนโดสปอร์มีสมบัติทนต่อแสงยูวี ความร้อนสภาวะแห้งและสารเคมีต่างๆได้ดีกว่าเซลล์มีชีวิต *Bacillus spp.* เจริญได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงหลายชนิดแม้ในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ โดยที่องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อลักษณะของโคโลนี เช่น ลักษณะกลมหรือไม่กลม ทึบแสง มีสีครีม สีน้ำตาล บางสายพันธุ์มีสีแดง ส้ม ดำ *Bacillus spp.* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิกว้างคือ -5 -75 องศาเซลเซียส แต่ส่วนใหญ่ชอบอุณหภูมิปานกลาง เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใน 24 ชั่วโมง เชื้อจะเจริญและมีโคโลนีขนาดใหญ่ *Bacillus* บางสปีชีส์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง เช่น *B. stearothermophilus* เจริญได้ที่ 55-70 องศาเซลเซียส โดยปกติมักบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส และไม่เจริญที่ 37 องศาเซลเซียส *B.cereus* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส *Bacillus* ทนความเค็มได้เมื่อมีโซเดียมคลอไรด์ 2-25 เปอร์เซ็นต์ (Buchanan and Gibbons,1974)

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *Bacillus subtilis* 3 สายพันธุ์ คือ 14945,14947,14948 จากห้องปฏิบัติการโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยเก็บไว้ในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เหมาะสม (Nutrient broth) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้ทำการบ่มไว้ถ่ายใส่อาหารเลี้ยง(Nutrient broth) ในฟาก์สชมพู่ ปริมาตร 50 ml เพื่อเพิ่มปริมาณจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* ใช้ในการทดลองต่อไป

3.2 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาเทคโนโลยีการหมัก โครงการจัดตั้งคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.3 อุปกรณ์

1. เครื่องหมุนเหวี่ยง
2. หลอดแก้ว
3. จานเพาะเชื้อ
4. ตะเกียงแอลกอฮอล์
5. แท่งแก้วรูปตัวแอล
6. แล๊คใส่หลอดทดลอง
7. ลูป
8. เครื่องเขย่า
9. พีเอชมีเตอร์
10. บีกเกอร์ 500ml,1000ml
11. ขวดรูปชมพู่ 500ml
12. เทอร์โมมิเตอร์
13. hot plate
14. กระบอกตวง

3.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์

1. NaCl
2. KCl
3. $NaHCO_3$
4. Pepsin
5. Pancreatin
6. Bile salt
7. NaOH
8. HCl conc.

3.5 วิธีการศึกษา

ตอนที่ 1 การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุด

กระเพาะเทียม

ถ่ายเชื้อ *Bacillus subtislis* 3 สายพันธุ์ คือ 45 47 48
ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ NB

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

ปิเปตเชื้อจากหลอดทดลอง 1 ml
ใส่ใน flask ที่มี NB ปริมาตร 50 ml

↓

เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm ที่อุณหภูมิห้อง

↓

ดูดใส่หลอดปลอดเชื้อ 5 ml

↓

Heat shock ที่อุณหภูมิ 80 องศา นาน 10 นาที

ทำให้อุณหภูมิเย็นลง

ทำการเจือจาง 10^{-1}- 10^{-7}

ปิเปตเชื้อ 0.1 ml นำมาทำการ spread plate ใน NA

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตรวจนับจำนวนสปอร์

คัดเลือกเอาสายพันธุ์ที่มีจำนวนสปอร์
มากที่สุดทำการทดลองในขั้นตอนที่ 2 ต่อไป

ตอนที่ 2 ศึกษาสายพันธุ์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ใช้เป็นอาหารสัตว์

นำสายพันธุ์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้ว
ถ่ายลงในหลอดทดลองที่มี Nutrient broth ปริมาตร 10 ml

ไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ถ่ายเชื้อ 1 ml ลงใน flask ที่มี Nutrient broth ปริมาตร 50 ml

ไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm

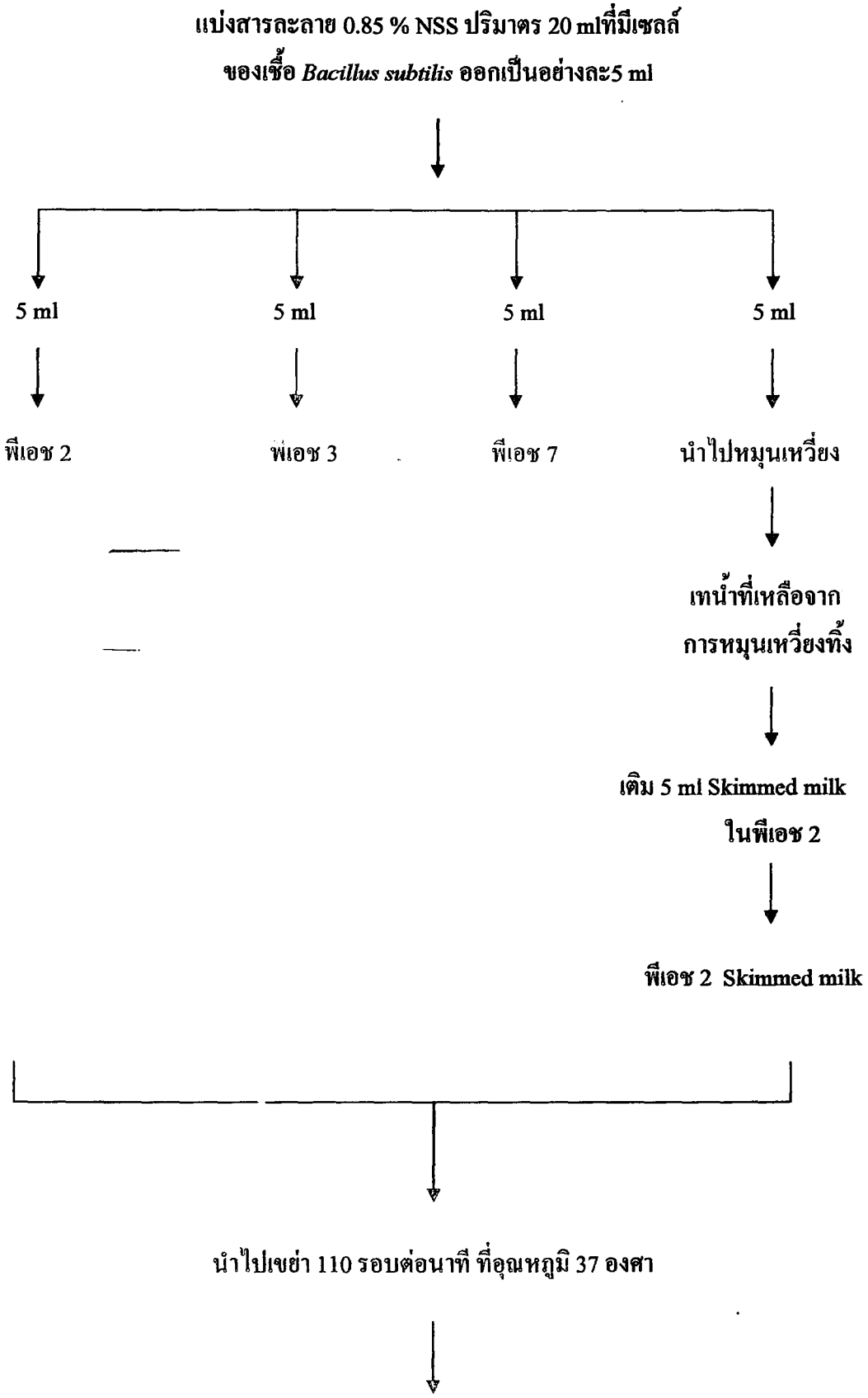
นำเชื้อที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ ความเร็ว10,000 รอบ
เวลา 10 นาทีอุณหภูมิ 4 องศา

เจือจางปริมาณเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85 % NSS ปริมาตร 10 ml

นำเชื้อที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ ความเร็ว10,000 รอบ
เวลา 10 นาทีอุณหภูมิ 4 องศา

เจือจางปริมาณเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85 % NSS ปริมาตร 20 ml

96844


แบ่งสารละลาย 0.85 % NSS ปริมาตร 20 mlที่มีเซลล์
ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ออกเป็นอย่างละ5 ml
5 ml
5 ml
5 ml
5 ml
พีเอช 2
พีเอช 3
พีเอช 7
นำไปหมุนเหวี่ยง
เทน้ำที่เหลือจาก
การหมุนเหวี่ยงทิ้ง
เติม 5 ml Skimmed milk
ในพีเอช 2
พีเอช 2 Skimmed milk
นำไปเขย่า 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศา

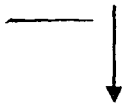
ทำการตรวจนับจำนวนสปอร์ที่หลงเหลือในกระเพาะเทียม
โดยการ pour plate Technic ที่เวลา 0,90,180 นาที ในอาหาร Nutrient Agar

ลำไส้เทียม

ถ่ายเชื้อจากพีเอช 2,3,7,2 Skimmed milk
จากในกระเพาะเทียม อย่างละ 5 ml

ใส่ลงใน พีเอช 8 ในแต่ละ flask

นำไปเขย่า 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศา



ทำการตรวจนับจำนวนสปอร์ที่หลงเหลือในลำไส้เทียม
โดยการ pour plate Technic ที่เวลา 90,180 นาทีในอาหาร Nutrient Agar

หมายเหตุ ที่เวลา 0 นาทีของลำไส้เทียม คือ เวลา 180 นาทีในกระเพาะเทียม

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุด

จากการทดลองนำเชื้อ *Bacillus subtilis* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 14945 , 14947 และ 14948 ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์เพื่อมาทำการตรวจดูว่าสายพันธุ์ใดที่สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุด (ตาราง 4.1) โดยได้นำเชื้อ *B. subtilis* ทั้ง 3 สายพันธุ์มาทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร Nutrient Broth (NB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 -24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์มาทำการเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm และทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงทำการ spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงผลดัง ตาราง 4.1 พบว่าสายพันธุ์ 14947 ตรวจนับจำนวนสปอร์ได้มากที่สุดคือ 9.0 $x10^8$ CFU/ml รองลงมาคือสายพันธุ์ 14948 ตรวจนับจำนวนสปอร์ได้ 2.9 $x10^8$ CFU/ml และสายพันธุ์ 14945 ตรวจนับจำนวนสปอร์ได้น้อยที่สุด คือ 1.7 x 10^7 CFU/ml จากผลการตรวจนับจำนวนสปอร์ พบว่าสายพันธุ์ 14947 เป็นสายพันธุ์ที่มีจำนวนสปอร์มากที่สุดจึงเหมาะสมที่จะนำไปทำการศึกษาการทนต่อสภาวะจำลองของกระเพาะและลำไส้

ตาราง 4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่สามารถสร้างสปอร์ได้มากที่สุด

สายพันธุ์ของเชื้อ *Bacillus subtilis*	ผลการทดลอง
14945	1.7 x 10^7
14947	9.0 $x10^8$
14948	2.9 x 10^8

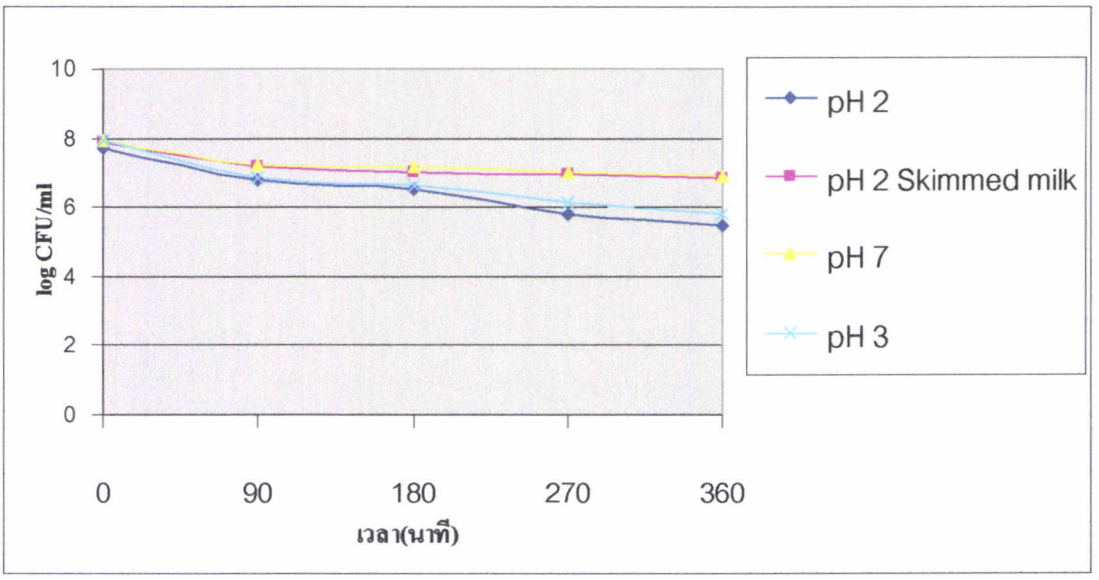
4.2 ศึกษาการทนต่อสภาวะจำลองของกระเพาะและลำไส้ของสปอร์สายพันธุ์ 14947

จากการศึกษาสปอร์ของสายพันธุ์ 14947 ที่ทนต่อสภาวะกระเพาะเทียมโดยศึกษาในระดับพีเอช 2, 3 ,7 และ skimmed milk (พีเอช 2) ที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ที่เวลา 0 ,90 และ 180 นาที และผ่านเข้าสู่ลำไส้เทียม (พีเอช 8) ที่เวลา 0 (180 นาทีของกระเพาะเทียม), 90 และ 180 นาทีผลดัง ตาราง 4.2 พบว่าระดับ พีเอช 2 และพีเอช 3 มีจำนวนสปอร์หลงเหลืออยู่น้อยกว่าระดับพีเอช 7 และ skimmed milk (พีเอช 2) เนื่องจากพีเอช 7 มีสภาวะความเป็นกลางจึงไม่เกิดการทำลายสปอร์ของเชื้อ ทำให้มีสปอร์หลงเหลืออยู่มากเพียงพอผ่านเข้าสู่ลำไส้เทียม สำหรับ skimmed milk (พีเอช 2) มีสปอร์หลงเหลือเนื่องจาก skimmed milk ไปห่อหุ้มสปอร์ของเชื้อ สปอร์ของเชื้อจึงถูกทำลายจากสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะเทียมได้น้อย ดังนั้นเวลานำเชื้อไปใช้เป็นโปรไบโอติกจึงควรให้สัตว์บริโภคในสภาวะที่กระเพาะสัตว์เป็นกลาง (พีเอช 7) หรือ ควรนำไปผสมกับอาหารแล้วให้สัตว์บริโภค เช่น skimmed milk (พีเอช 2) เพื่อให้มีสปอร์ได้หลงเหลือถึงลำไส้โดยสปอร์ของเชื้อจะไปยึดเกาะติดบริเวณผนังลำไส้ยึดพื้นที่ไม่ให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคมายึดติดทำให้สัตว์เมื่อบริโภคอาหารโปรไบโอติกเข้าไปมีภูมิต้านทานต่อโรคมากขึ้นและมีสุขภาพดีขึ้นนอกจากนี้ยังเป็นการเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ ได้ด้วย

ตาราง 4.2 ศึกษาการทนต่อสภาวะจำลองของกระเพาะและลำไส้ของสปอร์สายพันธุ์ 14947

ปัจจัย	กระเพาะเทียม			ลำไส้เทียม	
	0 นาที	90 นาที	180 นาที	90 นาที	180 นาที
พีเอช 2	5.3×10^7	6.2×10^6	3.1×10^6	6.0×10^5	3.0×10^5
พีเอช 2 S	7.6×10^7	1.38×10^7	1.02×10^7	8.3×10^6	6.4×10^6
พีเอช 7	8.5×10^7	1.58×10^7	1.43×10^7	9.7×10^6	7.6×10^6
พีเอช 3	6.2×10^7	7.2×10^6	4.1×10^6	1.4×10^6	6.0×10^5

ภาพที่ 4.1 กราฟการเปรียบเทียบแสดงจำนวนสปอร์ที่อยู่รอดในสภาวะแตกต่างกันของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในกระเพาะและลำไส้เทียม



บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองดูการเจริญและสปอร์สายพันธุ์ *B. subtilis* 3 สายพันธุ์ ได้แก่ 14945, 14947,14948ใน Nutrient Broth (NB) พบว่าสายพันธุ์ที่เจริญและสร้างสปอร์ได้ดีที่สุด คือ สายพันธุ์ 14947 ดังนั้นจึงเลือกสายพันธุ์ดังกล่าว เพื่อใช้ในการทดลองต่อไปในกระเพาะเทียม และลำไส้เทียม

จากการทดลองดูการทนต่อสภาวะกระเพาะเทียมและลำไส้เทียมของสายพันธุ์ 14947 ที่ได้นำมาผ่านกระเพาะเทียมและลำไส้เทียมระดับพีเอช 2 , 3, 7 และ Skimmed milk (พีเอช 2) พบว่าจำนวน สปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ระดับ pH 7 , Skimmed milk (พีเอช 2) จะทนต่อสภาวะกระเพาะเทียมและลำไส้เทียมได้มากที่สุด ส่วนระดับพีเอช 2 และ 3 สปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ไม่ทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะเทียมได้ สำหรับสปอร์ที่หลงเหลือจากกระเพาะเทียมเมื่อผ่านเข้าสู่ลำไส้เทียมแล้วมีอัตราการลดลงน้อยมาก เนื่องจากในลำไส้เทียมมีสภาวะความเป็นด่าง (พีเอช 8) ในด้านอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เมื่อต้องการนำเชื้อ *B. subtilis* มาใช้เป็นโปรไบโอติกให้เกิดประโยชน์สูงสุด ควรจะนำไปสัตว์บริโภคโดยนำไปผสมกับอาหาร เช่น Skimmed milkโดย Skimmed milk จะทำหน้าที่ห่อหุ้มและปกป้องสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* จากสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะให้จำนวนสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* อยู่รอดจนถึงลำไส้ได้ เพื่อที่สปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* จะไปเกาะติดและยึดพื้นที่ ไม่ให้เซลล์ก่อโรคไปเกาะติดที่ผนังลำไส้ของสัตว์ได้ ทำให้สัตว์ที่บริโภคโปรไบโอติกเข้าไปมีภูมิต้านทานต่อโรคมากขึ้นและมีสุขภาพดีขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นการเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ ได้ด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. ในระหว่างขั้นตอนการถ่ายเชื้อจนถึงการบ่มเชื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเมื่อทำการตรวจนับจำนวนสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ควรตรวจนับสปอร์ทั้งบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อและในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างละเอียด
2. ควรนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปอบก่อนนำไป Pour plate และ Spread plate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ละอองน้ำระเหยและจุลินทรีย์ที่ตกค้างในจานเพาะเลี้ยงเชื้อไม่ให้เกิดการปนเปื้อนมาในระหว่างการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

วรพจน์ สุนทรสุข และเกวลี จันทร์พันธุ์. 2545 การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ในบ่อกุ้ง , วิทยานิพนธ์ , มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี , กรุงเทพ

ศุภชัย บุญนำมา และคณะ 2543 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต Bacilius subtilis ในอุตสาหกรรมโปรไบโอติก , รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2543 , มหาวิทยาลัยเทคโนโนลีพระจอมเกล้าธนบุรี กรุงเทพ.

สถาพร ดิเรกบุษราคม. 2543 . ทิศทางการวิจัยโรคกุ้งศตวรรษใหม่ KU Electronic Maganizine ฉบับ ที่ 4 ปีที่ 1 เดือน 2543. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

สุชล แก้วพรม. 2539. การศึกษาการควบคุมโรคข้าวแบบชีววิธีโดยจุลทรีย์ปฏิปักษ์ Bacillus subtilis ในระดับห้องปฏิบัติการ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา

Andremont,A., 2000. Consequences of antibiotic therapy to the intestinal ecosystem. Ann. Fr Anesth. Reanim. 19,395-402

Ashiuchi, M., Tani, K., Soda, K., Misono, H., 1998. Properties of glutamate racemase from *Basillus subtilis* IFO 3336 producing poly-gamma-glutamate. J. Biochem. 123,1156-1163

Burgat, V., 1991. Residue of drugs of veterinary use in food. Rev. Prat. 41, 985-990

Cavazzoni, V., Adami, A., Castrovilli, C., 1998. Performance of broiler chickens supplemented with *Bacillus coagulans* as probiotic. Br. *Poult. Sci.* 39, 526-529

Endo, T., Nakano, M., 1999. Influence of a probiotic on productivity, meat components, lipid Matabolism, caecal flora and metabolites, and raising environment in broiler production. *Anim. Sci. J.* 70, 207-218

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

Jiraphocakul, S., Sullivan, T.W., Shahani, K.M., 1990. Influence of a dried *Bacillus subtili s* Culture and antibiotics on performance and intestinal microflora in turkeys. *Poult. Sci.* 69, 1966-1973.

Nahashon, S.N., Nakaue, H.S., Mirosh, L.W., 1994. Production variable and nutrient retention in single comb white leghorn laying pullets fed diets supplemented with direct-fed microbials. Poult. Sci. 73, 1699-1711.

Samznya,M. and Yamuachi, K., 2001. Morphological change of the intestinal villi in chicken fed dietary charcoal poeder,including wood vinegar compound. *J.poult.sci.*38:289-301.

Santoso, U., Tanaka, K., Ohtani, S., 1995. Effect of dried *Bacillus subtili s* culture ongrowth, Body composition and hepatic lipogenic enzym activity in female broiler chicks. Br. J. Nutr. 74, 523-529.

Santoso, U., Tanaka, K., Ohtani, S., Sakaida, M., 2001. Effect of fermented product from *Bacillus subtili s* on feed conersion efficiency, lipid accumulation and ammonia Production in broiler chicks. Asian-Aust. *J. Anim. Sci.* 14, 333-337

Shamoto,K. and Yamauchi, K., 2000. Recovery responses of chick intestinal villus morphology to different refeeding procedures. *Poult.sci.*79:718-723

Sissons, J.W.,1989. Potential of probiotic organism to provent diarrhoea and promote digestion in farm animals: a review. J. Sci. Food Agric. 49, 1-13

Tamura, M., 1989. Development of low-smelling natto. Liftsci. Biotechnol. 5, 104-108. In Japanese.

Tournut, J., 1989. Applications of probiotics to animal husbandry. Rev. Sci Technol. Off. Int. Epiz.8, 551-566

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Nurtrient Agar

Beef extract	3.0 g
Peptone	5.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1 L

Nurtrient Broth

Meat extract	5.0 g
Peptone	3.0 g

ภาคผนวก ข สารที่ใช้เตรียมกระเพาะและลำไส้จำลอง

ในสภาวะกระเพาะสัตว์จำลอง

NaCl	1.460g/200ml
KCl	0.150g/200ml
$NaHCO_3$	0.755g/200ml
Pepsin	0.600g/200ml

โดยผสม NaCl , KCl , $NaHCO_3$ เข้าด้วยกัน 4 flask flask ละ 50 ml แล้วปรับ PH 2,3,7,2Skim milk อย่างละ 1 flask ก่อนนำมาผสมกับ Pepsin

ในสภาวะลำไส้จำลอง

ผสม 0.1% Pancreatin , 0.15% Bile Salt แล้วปรับพีเอช 8 จำนวน 4 flask flask ละ 50 ml