การคัดแยก และศึกษาคุณสมบัติของบาซิลลัสเพื่อใช้เป็นสารเสริมโพรไบโอติกในไก่ไข่

Isolation and characterization of *Bacillus* species for use as probiotic supplement in laying hen

อรทัย แดงสวัสดิ์

Orathai Dangsawat

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Agricultural Science and Technology
Prince of Songkla University

2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การคัดแยก และศึกษาคุณสมบัติของบาซิลลัสเพื่อใช้เป็นสารเสริมโพรไบโอติกในไก่ไข่

Isolation and characterization of *Bacillus* species for use as probiotic supplement in laying hen

อรทัย แดงสวัสดิ์

Orathai Dangsawat

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Agricultural Science and Technology
Prince of Songkla University

2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดแยก และศึกษาคุณสมบัติของบาซิลลัสเพื่อใช้เป็นสารเสริมโพรไบโอติกในไก่ไข่

ผู้เขียน นางสาวอรทัย แดงสวัสดิ์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ดร.ปฏิมา เพิ่มพูนพัฒนา)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจษฎา รัตนวุฒิ)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีร ศรีสวัสดิ์)

.....กรรมการ

(ดร.รพีวรรณ โสวรรณปรีชา)

.....กรรมการ

(ดร.ปฏิมา เพิ่มพูนพัฒนา)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจษฎา รัตนวุฒิ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ดร.ปฏิมา เพิ่มพูนพัฒนา)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจษฎา รัตนวุฒิ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ.....
(นางสาวอรทัย แดงสวัสดิ์)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวอรทัย แดงสวัสดิ์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดแยก และศึกษาคุณสมบัติของบาซิลลัสเพื่อใช้เป็นสารเสริมโพรไบโอติกในไก่ไข่

ผู้เขียน นางสาวอรทัย แดงสวัสดิ์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร

ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดแยก และศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัสที่สร้างสปอร์จากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ลำไส้ครัสเตเชียน ดินบ่อกุ้ง ดินบ่อน้ำพุร้อน และมูลไก่ เพื่อนำไปใช้เป็นสารเสริมในไก่ไข่ เมื่อจัดจำแนกแบคทีเรียเบื้องต้นโดยอาศัยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี พบแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัสจำนวน 13 ไอโซเลต ทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างสปอร์ พบประสิทธิภาพการสร้างสปอร์สูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ OYNH31 CPPES01T2 CKNJh11 SHPS1 HHPS5 และ THPS1 ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าไอโซเลต CPPES01T2 CKNJh11 และ HHPS5 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าไอโซเลต OYNH31 CPPES01T2 และ THPS1 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ แบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถทนต่อความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ได้ ไอโซเลต CPPES01T2 CKNJh11 และ THPS1 ไม่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดง ทนต่อกรดและเกลือน้ำดีเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อนำสปอร์ไอโซเลต CPPES01T2 CKNJh11 และ THPS1 มาผสมในอาหารไก่ พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จากการจัดจำแนกโดยใช้ยีน *gyrA* คาดว่าไอโซเลต CKNJh11 อาจเป็น *Bacillus* sp. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าไอโซเลต CKNJh11 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 16S rDNA คล้ายกับ *Bacillus aryabhattai* B8W22 โดยมีความเหมือนกันถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปเสริมเป็นโพรไบโอติกในอาหารไก่ไข่รูปแบบสปอร์ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ระดับ 10^6 สปอร์ มีแนวโน้มทำให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตไข่ มวลไข่ และน้ำหนักเปลือกไข่เพิ่มขึ้น มีผลทำให้จำนวนของ *Salmonella* sp. และ *Escherichia coli* ในมูลไก่ลดลง ในขณะที่จำนวนของแบคทีเรียกรดแล็กติกในมูลไก่เพิ่มขึ้น ซึ่งผลการวิจัยประสิทธิภาพของบาซิลลัสโพรไบโอติกที่สร้างสปอร์สามารถนำไปสู่การพัฒนา และประยุกต์ใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงสัตว์ปีกได้

คำสำคัญ: การคัดแยก คุณสมบัติ บาซิลลัส โพรไบโอติก สารเสริม ไก่ไข่

Thesis Title Isolation and characterization of *Bacillus* species for use as probiotic supplement in laying hen

Author Miss Orathai Dangsawat

Major Program Agricultural Science and Technology

Academic Year 2019

ABSTRACT

This study aimed to isolate *Bacillus* sp. spore forming bacteria from environments. Environment samples were crustacean intestine, shrimp pond sludge, hot spring soil and chicken feces. These samples were examined, according to the morphological and biochemical tests. The result showed that thirteen isolates had biochemical traits corresponded to *Bacillus* sp. The efficient spores with probiotic properties were extracting with over 70% of the spore efficiency OYNH31, CPPES01T2, CKNJh11, SHPS1, HHPS5 and THPS1. Antibiotic susceptibility test showed that the isolates CPPES01T2, CKNJh11 and HHPS5 were susceptible to antibiotics. Antibacterial activity of OYNH31, CPPES01T2 and THPS1 were also revealed against tested pathogenic bacteria and was showed tolerances to heat at 95°C for 30 minutes and 70% alcohol. All isolates CPPES01T2, CKNJh11 and THPS1 showed non-hemolysis and tolerance to bile salt and lower pH after 3 hours of incubation. When isolated bacteria were mixed into the feed for egg-laying hen, the survival rate of isolated bacteria was increased more than 80%. By using *gyrA* gene isolate CKNJh11 was identified as *Bacillus* sp., whereas 16S rDNA gene sequence analysis indicated 100% identity with *Bacillus aryabhattai* B8W22. Supplementation of encapsulated spores in laying hen diet at 10^6 spores tended to increase egg production, egg mass and eggshell weight. In the feces content, numbers of *Salmonella* sp. and *Escherichia coli* were decreased, while the numbers of lactic acid bacteria in the feces was increased. Therefore, this study clearly suggested the efficacy of *Bacillus* sp. as promising spore forming probiotic bacteria for further development in poultry production.

Keywords: isolation, characterization, *Bacillus*, probiotic, supplement, laying hen

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณบุคคลหลายท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือจนโครงการวิจัยนักศึกษาฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่ง ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ ดร.ปฏิมา เพิ่มพูนพัฒนา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจษฎา รัตนวุฒิ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี ผู้ซึ่งประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และให้คำปรึกษามาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีร ศรีสวัสดิ์ และดร.รพีวรรณ โสวรรณปรีชา อาจารย์สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ช่วยให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะต่าง ๆ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้อง และมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น รวมถึงให้ความช่วยเหลือและมีส่วนที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี สำหรับทุนสนับสนุนค่าธรรมเนียมการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาที่เน้นการศึกษาวิจัย ประจำปีการศึกษา 2561 และทุนอุดหนุนงานวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี ประจำปีงบประมาณ 2562 รวมไปถึงความอนุเคราะห์ทางด้านห้องปฏิบัติการ ครุภัณฑ์ และวัสดุอุปกรณ์ และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2561

อรทัย แดงสวัสดิ์

31 พฤษภาคม 2563

สารบัญ

บทคัดย่อ.....(5)
ABSTRACT.....(6)
กิตติกรรมประกาศ.....(7)
สารบัญ.....(8)
รายการตาราง.....(11)
รายการตารางภาคผนวก.....(12)
รายการภาพประกอบ.....(13)
รายการภาพภาคผนวก.....(14)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ.....(15)
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1
1.2 ตรวจสอบเอกสาร.....3
1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย.....21
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย.....22
2.1 วิธีการดำเนินการ.....22
2.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง.....22
2.1.2 การคัดแยกแบคทีเรีย และการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด.....22
2.1.3 การคัดแยกแบคทีเรีย และการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีให้ความร้อน.....22
2.1.4 การเลี้ยงแบคทีเรียให้บริสุทธิ์และการเก็บสต๊อกแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....23
2.1.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี.....22
2.1.6 การทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย.....24
2.1.7 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ.....25
2.1.8 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย.....25
2.1.9 การทดสอบการทนความร้อนและแอลกอฮอล์ของแบคทีเรีย.....26
2.1.10 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดของแบคทีเรีย.....26
2.1.11 การทดสอบการทนกรดในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดีของแบคทีเรีย...27

สารบัญ (ต่อ)

2.1.12 การเตรียมสปอร์และทดสอบคุณสมบัติของสปอร์เพื่อใช้เป็นสารเสริมโพรไบโอติก.....27
2.1.13 การห่อหุ้มสปอร์แบคทีเรียด้วยโซเดียมแอลจิเนต.....28
2.1.14 การวัดประสิทธิภาพการห่อหุ้ม การปลดปล่อยเซลล์ ขนาด และทดสอบคุณสมบัติการรอดชีวิตของสปอร์ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนต.....28
2.1.15 การจำแนกระดับสปีชีส์โดยการตรวจสอบยีน.....29
2.1.16 การทดสอบภาคสนามเพื่อตรวจสอบผลของการเสริมโพรไบโอติก.....31
2.2. วัสดุอุปกรณ์การวิจัย.....33
2.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....33
2.2.2 สารเคมี.....34
2.2.3 เครื่องมือวิทยาศาสตร์.....35
2.2.4 แบคทีเรีย.....35
2.2.5 อุปกรณ์.....35
2.2.6 สัตว์ทดลอง.....35
2.2.7 อาหารไก่.....35
บทที่ 3 ผลการทดลอง.....37
3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลต.....37
3.2 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลต.....38
3.3 การศึกษาประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียไอโซเลต.....39
3.4 การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียไอโซเลต.....40
3.5 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลต.....42
3.6 การทดสอบความสามารถในการทนต่อความร้อนและแอลกอฮอล์ของแบคทีเรียไอโซเลต.....42
3.7 การทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรีย.....45
3.8 การทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีของแบคทีเรียไอโซเลต.....47

สารบัญ (ต่อ)

3.9 การผสมสปอร์แบคทีเรียในอาหารไก่ไข่ และทดสอบอัตราการรอดชีวิตของสปอร์.....50
3.10 การวัดประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์ การปลดปล่อยเซลล์ ขนาดของเม็ดเจล และทดสอบคุณสมบัติการรอดชีวิตของสปอร์ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนต.....53
3.11 การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตในอาหารไก่ไข่.....55
3.12 การจำแนกแบคทีเรียไอโซเลตระดับสปีชีส์โดยการตรวจสอบยีน และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดย 16S rDNA.....56
3.13 ผลของการเสริมโพรไบโอติกในอาหารไก่ไข่ ต่อสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพไข่.....61
3.14 ผลการเสริมโพรไบโอติกต่อจำนวนแบคทีเรีย *Salmonella* sp., *Escherichai coli* และแบคทีเรียกรดแล็กติกในมูลไก่.....65
บทที่ 4 วิจารณ์ผลการทดลอง.....67
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....77
5.1 สรุปผลการวิจัย..... 77
5.2 ข้อเสนอแนะ.....77
บรรณานุกรม.....79
ภาคผนวก.....91
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....92
ภาคผนวก ข การทดสอบทางชีวเคมี.....97
ภาคผนวก ค ข้อมูลรายละเอียดผลการทดลอง.....102
ประวัติผู้เขียน.....122

รายการตาราง

ตารางที่ 1 ค่า pH ในระบบทางเดินอาหารของไก่....14
ตารางที่ 2 แบคทีเรียประจำถิ่นที่พบในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง สุกร สัตว์ปีก....15
ตารางที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลต....37
ตารางที่ 4 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลต....39
ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียไอโซเลต....41
ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งบนอาหาร MHA....43
ตารางที่ 7 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการทนต่อความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์....44
ตารางที่ 8 ความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดบนอาหารแข็ง Sheep blood ของแบคทีเรียไอโซเลต....45
ตารางที่ 9 อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียไอโซเลตต่อการทนเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง....48
ตารางที่ 10 อัตราการรอดชีวิตต่อการทนกรดของแบคทีเรียไอโซเลตที่ pH 2.0, 2.5 และ 3.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง....49
ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบคุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียไอโซเลต....52
ตารางที่ 12 อัตราการปลดปล่อยเซลล์ ประสิทธิภาพการห่อหุ้ม ขนาดของเม็ดเจล และการทนต่อกรดเกลือน้ำดีของเม็ดแอลจิเนตแบบเปียกและแบบแห้งของไอโซเลต CKNJh11....54
ตารางที่ 13 ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลNCBI....59
ตารางที่ 14 ผลของการเสริมโพรไบโอติกในอาหารต่อสมรรถภาพการผลิตของไก่ไข่เป็นเวลา 6 สัปดาห์....62
ตารางที่ 15 ผลของการเสริมโพรไบโอติกในอาหารต่อคุณภาพไข่เป็นเวลา 6 สัปดาห์....64
ตารางที่ 16 ผลของการเสริมโพรไบโอติกต่อปริมาณ *Salmonella* sp., *Escherichia coli* และแบคทีเรียกรดแล็กติกในมูลของไก่ไข่ (log10 CFU/g of feces)....66

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 สูตรอาหารและส่วนประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง.....96
ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงผลจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกได้จากมูลไก่ และดินบ่อน้ำพุร้อน.....103
ตารางภาคผนวกที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียไอโซเลต.....104
ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียไอโซเลต.....109
ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการเสริมโพรไบโอติกกลุ่มบาซิลลัสต่อสมรรถภาพการผลิตไข่ และคุณภาพไข่ (สัปดาห์ที่ 1).....113
ตารางภาคผนวกที่ 6 ผลการเสริมโพรไบโอติกกลุ่มบาซิลลัสต่อสมรรถภาพการผลิตไข่ และคุณภาพไข่ (สัปดาห์ที่ 2).....114
ตารางที่ภาคผนวก 7 ผลการเสริมโพรไบโอติกกลุ่มบาซิลลัสต่อสมรรถภาพการผลิตไข่ และคุณภาพไข่ (สัปดาห์ที่ 3).....115
ตารางภาคผนวกที่ 8 ผลการเสริมโพรไบโอติกกลุ่มบาซิลลัสต่อสมรรถภาพการผลิตไข่ และคุณภาพไข่ (สัปดาห์ที่ 4).....116
ตารางภาคผนวกที่ 9 ผลการเสริมโพรไบโอติกกลุ่มบาซิลลัสต่อสมรรถภาพการผลิตไข่ และคุณภาพไข่ (สัปดาห์ที่ 5).....117
ตารางภาคผนวกที่ 10 ผลการเสริมโพรไบโอติกกลุ่มบาซิลลัสต่อสมรรถภาพการผลิตไข่และคุณภาพไข่ (สัปดาห์ที่ 6).....118

รายการภาพประกอบ

ภาพที่ 1 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. 3
ภาพที่ 2 เอนโดสปอร์ ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. 4
ภาพที่ 3 วงจรชีวิตของการสร้างสปอร์.....5
ภาพที่ 4 การห่อหุ้มโพรไบโอติกในเม็ดเจล.....10
ภาพที่ 5 ระบบทางเดินอาหารของไก่.....13
ภาพที่ 6 ประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียไอโซเลตบนอาหาร DSM.....40
ภาพที่ 7 การทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียไอโซเลต.....46
ภาพที่ 8 การทดสอบความสามารถการย่อยเม็ดเลือดแดงของ *V .parahaemolyticus, P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. subtilis* ATCC 6633.....46
ภาพที่ 9 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์แบคทีเรียไอโซเลต CPPES01T2 เมื่อผสมในอาหารไก่ไข่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....50
ภาพที่ 10 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์แบคทีเรียไอโซเลต CKNJh11 เมื่อผสมในอาหารไก่ไข่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....51
ภาพที่ 11 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์แบคทีเรียไอโซเลต THPS1 เมื่อผสมในอาหารไก่ไข่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....51
ภาพที่ 12 ลักษณะเม็ดเจลแอลจิเนตที่ห่อหุ้มสปอร์ด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โซเดียมแอลจิเนต.....55
ภาพที่ 13 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์แบคทีเรียไอโซเลต CKNJh11 หลังห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตเมื่อผสมในอาหารไก่ไข่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....56
ภาพที่ 14 ผลการแยกดีเอ็นเอบนแผ่นอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในการวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอจากแบคทีเรียไอโซเลต CKNJh11.....57
ภาพที่ 15 ผลการแยกผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บนแผ่นอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในการวิเคราะห์ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแบคทีเรียไอโซเลต CKNJh11.....58

รายการภาพภาคผนวก

ภาพภาคผนวกที่ 1 วิธีการทดสอบทางชีวเคมีของขั้นตอนการทดสอบออกซิเดส.....99
ภาพภาคผนวกที่ 2 วิธีการทดสอบทางชีวเคมีของขั้นตอนการทดสอบการเคลื่อนที่.....99
ภาพภาคผนวกที่ 3 วิธีการทดสอบทางชีวเคมีของขั้นตอนการทดสอบอินโดล.....100
ภาพภาคผนวกที่ 4 วิธีการทดสอบทางชีวเคมีของขั้นตอนการทดสอบแคทาเลส.....100
ภาพภาคผนวกที่ 5 วิธีการทดสอบทางชีวเคมีของขั้นตอนการทดสอบไฮโดรลิซิสแป้ง.....101
ภาพภาคผนวกที่ 6 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ATCC 6633 โดยใช้ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต OYNH31.....109
ภาพภาคผนวกที่ 7 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ATCC 6633 โดยใช้เซลล์แบคทีเรียไอโซเลต OYNH31.....110
ภาพภาคผนวกที่ 8 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ATCC 6633 โดยใช้เซลล์แบคทีเรียไอโซเลต CPPES01T2.....110
ภาพภาคผนวกที่ 9 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* โดยใช้เซลล์แบคทีเรียไอโซเลต CPPES01T2.....111
ภาพภาคผนวกที่ 10 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 โดยใช้เซลล์แบคทีเรียไอโซเลต THPS1.....111
ภาพภาคผนวกที่ 11 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* โดยใช้ใช้ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต THPS1.....112
ภาพภาคผนวกที่ 12 การสร้างสปอร์ของแบคทีเรียบนอาหาร DSM.....112
ภาพภาคผนวกที่ 13 ลักษณะของกรงที่ใช้เลี้ยงไก่.....119
ภาพภาคผนวกที่ 14 การผสมโพรไบโอติกในอาหารเลี้ยงไก่.....119
ภาพภาคผนวกที่ 15 ลักษณะมูลของไก่.....120
ภาพภาคผนวกที่ 16 การวัดคุณภาพของไข่ไก่โดยเครื่องมือวัดคุณภาพอัตโนมัติ.....121

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

%	=	เปอร์เซ็นต์ (อัตราร้อยละ)
NA	=	Nutrient Agar (อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง)
NB	=	Nutrient broth (อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว)
MHA	=	Mueller Hinton Agar
LB	=	Luria-Bertani broth
DSM	=	Difco Sporulation Medium
SS	=	Salmonella Shigella agar
EMB	=	Eosin Methylene Blue agar
MRS	=	De Man Rogosa and Sharpe agar
µg	=	Microgram
µl	=	Microliter
ml	=	Milliliter
kg	=	Kilogram
mM	=	Millimolar
µM	=	Micromolar
CFU	=	Colony Forming Unit
w/v	=	ร้อยละโดยมวลต่อปริมาตร
g	=	gram
SEM	=	Standard Error of Mean
pH	=	ความเป็นกรด-เบส

บทที่ 1
บทนำ

1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไก่ไข่เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งการเลี้ยงไก่ไข่ต้องคำนึงถึงผลผลิตและคุณภาพของไข่มากขึ้นเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค เช่น ไข่ไก่ต้องมีขนาดใหญ่ เปลือกหนา หรือไข่แดงมีสีแดงเข้ม อุตสาหกรรมอาหารสัตว์และเกษตรกรผู้เลี้ยงไก่ไข่จึงมีความต้องการปรับปรุงคุณภาพของผลผลิตให้ดีขึ้นด้วยวิธีการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ แต่ด้วยปัญหาการตกค้างของสารเคมีสังเคราะห์ และยาปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ รวมถึงสารสังเคราะห์เหล่านี้ต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้อาหารไก่ไข่มีราคาสูงขึ้น ทำให้ผู้ผลิตจำเป็นต้องตระหนักถึงมาตรการหรือการปรับปรุงกระบวนการเลี้ยงสัตว์ที่หลีกเลี่ยงการใช้สารปฏิชีวนะที่ก่อให้เกิดปัญหาดังกล่าว จึงมีการใช้สารที่ได้จากธรรมชาติ หรือสิ่งมีชีวิตในกลุ่มจุลินทรีย์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ซึ่งสารสีที่ได้จากจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกสามารถนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารสัตว์ปีกอีกด้วย เช่น ทำให้ผิวหนังของไก่เป็นสีเหลือง ทำให้สีของไข่แดงมีสีเข้มมากขึ้น ช่วยปรับปรุงคุณภาพและผลผลิตไข่ (Upadhaya et. al., 2019) นอกจากนี้ยังช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของสัตว์ได้อีกด้วย (Bami et. al., 2017)

จุลินทรีย์สร้างสารสีและมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกสามารถคัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อมทั่วไป ได้แก่ ในน้ำแร่ธรรมชาติ สาหร่ายทะเล พืชชนิดต่าง ๆ (Goodfellow et. al., 1976) น้ำทะเล (Gauthier, 1976) และแหล่งอื่น ๆ ในขณะที่แบคทีเรียที่สามารถสร้างสารสีในกลุ่ม *Bacillus* sp. มีการศึกษาและคัดแยกจากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ได้แก่ สิ่งแวดล้อมทางทะเล (Khaneja et. al., 2009) ในอุจจาระมนุษย์ (Hong et. al., 2009) สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น กุ้ง และปู (Beleneva, 2008) ในดินจากบ่อเลี้ยงกุ้ง (Khaneja et. al., 2009) จากระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก (Nguyen et. al., 2015) และจากระบบทางเดินอาหารมนุษย์ (Huynh et. al., 2009 อ้างโดย Khaneja et. al., 2009) เป็นต้น จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่สร้างสารสีและมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกสามารถคัดแยกได้จากสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีการแพร่กระจายโดยทั่วไปในธรรมชาติ

แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกที่มีความสามารถในการสร้างสปอร์ได้ และมีชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี โดยส่วนใหญ่มักมีโคโลนีเป็นสีทอง เหลือง ส้ม แดง ขาวครีม และชมพู สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศหรือสภาวะที่ไม่มีอากาศ

สามารถสร้างเอนโดสปอร์ ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ การสร้างสปอร์เป็นการสร้างเพื่อดำรงชีพไม่ใช่เพื่อการสืบพันธุ์ อีกสปอร์ยังสามารถทนต่อความร้อนและสภาพแวดล้อมในระบบทางเดินอาหารได้ดี นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยเมื่อนำมาใช้ในอาหาร และส่งผลดีต่อสุขภาพ ได้แก่ การผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารให้เหมาะสม (Kovacs et al., 2010) ทำให้ระบบย่อยอาหารทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้อีกด้วย (Lee et al., 2017) จากงานวิจัยของผู้จัดทำก่อนหน้านี้ได้มีการคัดแยกแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัสจากลำไส้ไก่ และนำสปอร์ไปเสริมเป็นโพรไบโอติกให้กับไก่ไข่ พบว่ามีผลทำให้น้ำหนักไข่และความหนาของเปลือกไข่เพิ่มขึ้น (อรทัย และคณะ, 2562) ถึงแม้จะมีการคัดแยกกันอย่างกว้างขวาง ปัจจุบันก็ยังคงมีการคัดแยกเพื่อหาแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกดีที่สุดมาประยุกต์ใช้อย่างต่อเนื่อง

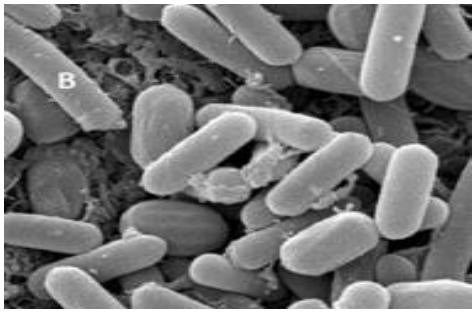
จากข้างต้นจะเห็นได้ว่า แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. มีคุณประโยชน์มากมายทั้งในด้านอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม ด้วยเหตุนี้ทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจคัดแยกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน โดยคัดแยกแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. จากลำไส้ครัสเตเชียน ดินบ่อกุ้ง ดินบ่อน้ำพุร้อน และมูลไก่ เพื่อใช้เป็นสารเสริมโพรไบโอติกในไก่ไข่ ส่งเสริมให้ไก่มีสุขภาพดี เพิ่มสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพไข่ อีกทั้งเป็นแนวทางในการลดการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีสังเคราะห์ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์

1.2. ตรวจสอบเอกสาร

1.2.1 แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp.

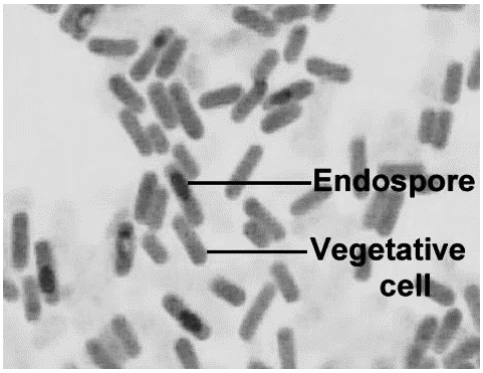
แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ถ้าเปรียบเทียบกับสกุลอื่น ๆ จะมีคุณสมบัติแตกต่างกันมาก เช่น บางชนิดมีความสามารถในการสร้างกรดแล็กติก (Lactic acid) และเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ (Thwaite and Atkins, 2012) บางชนิดดำรงชีวิตแบบ facultative anaerobe ใช้ไฮโดรเจนเป็นแหล่งของพลังงานได้ มีความต้องการอาหารแตกต่างกัน อุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 25-75 องศาเซลเซียส ทนเกลือได้อยู่ในช่วง 2-25 เปอร์เซ็นต์ โดยลักษณะสำคัญของ *Bacillus* sp. มีดังนี้

1. รูปร่าง แบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแท่ง (Bacilli, Rod) ไม่ค่อยมีแบบแผนการเรียงตัวของเซลล์ที่เด่นชัดเท่าพวกแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม แต่อาจมีการเรียงตัวของเซลล์เนื่องมาจากระยะการเจริญหรือขึ้นอยู่กับสภาพการเลี้ยงในอาหารนั้น ๆ โดยทั่วไปเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* มักอยู่เดี่ยว ๆ ยกเว้นเซลล์บางชนิดแบคทีเรียรูปท่อนนี้อาจมีรูปร่างแปลกแตกต่างกันออกไป เช่น ถ้ามีการแตกกิ่งก้านสาขา (Branching rod) ถ้ามีลักษณะคล้ายบานออกที่หัวท้าย (Club-shaped rod) หรือมีการสร้างสปอร์อยู่ภายในเซลล์ (Spore forming rod) เป็นต้น รูปร่างเซลล์เป็นแท่งตรงหรือเกือบตรง ส่วนใหญ่มีการเคลื่อนที่โดยใช้เลเทอรอล แฟลกเจลลา (lateral flagella) สร้างเอนโดสปอร์ (Endospore) มี 1 อันต่อ 1 เซลล์ติดสีแกรมบวก (ภาพที่ 1) (Sella et al., 2014)



ภาพที่ 1 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp.
ที่มา: Sella et al., (2014)

2. เอนโดสปอร์ (Endospore) เอนโดสปอร์สามารถพบได้ในแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Bacillus* sp. เป็นโครงสร้างที่ทำให้แบคทีเรียมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ โดยเกิดขึ้นภายในเซลล์ (ภาพที่ 2) และสร้างได้เพียง 1 สปอร์ต่อ 1 เซลล์ ดังนั้นการสร้างสปอร์จึงไม่ใช่การสืบพันธุ์แต่เพียงการดำรงชีพเพื่อให้ดำรงอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม รูปร่างและตำแหน่งของสปอร์จะแตกต่างกันออกไปตาม สปีชีส์ เอนโดสปอร์สามารถทนต่อความแห้งแล้ง สีย้อม สารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อ รังสี และความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้ดี แต่ส่วนใหญ่ทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 80 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 10 นาที (Santos, 2015)

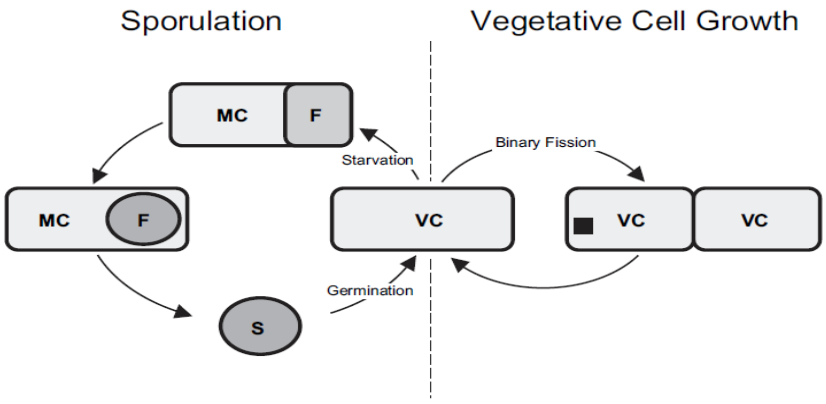


ภาพที่ 2 เอนโดสปอร์ของแบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp.
ที่มา: Chamberlain (2009)

3. การสร้างสปอร์ (Spore formation, Sporulation) การสร้างสปอร์ของแบคทีเรียจะเกิดในระยะ stationary หรือ stationary phase การสร้างสปอร์เป็นการเปลี่ยนแปลงทั้งด้านสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาที่แตกต่างไปจากเซลล์ปกติ การเจริญของเซลล์เพื่อให้เกิดการสร้างสปอร์นั้นมียีนมากกว่า 125 ยีนมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการนี้ (Losick, 1996) ลำดับการสร้างสปอร์จะมีการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ คือ ระยะที่ 1 เป็นระยะที่เซลล์แบคทีเรียมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และสารอื่น ๆ เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการสร้างสปอร์ โดยเฉพาะการสังเคราะห์สปอร์ oxidative enzyme ที่ใช้ระบบไซโทโครมเพื่อนำไปใช้ในการสร้างพลังงานอย่างรวดเร็ว ระยะ 2-3 เป็นระยะที่ DNA แพร่กระจายเต็มเซลล์ มีการเกิด mesosome จากการคอดเว้าของเยื่อหุ้มเซลล์จนกระทั่งเป็นผนังกั้นแบ่งโพรโทพลาซึมออกเป็นสองส่วน และส่วนเล็ก คือ บริเวณที่จะเป็นสปอร์ต่อไป เรียกว่า prespore หรือ fore spore ในแบคทีเรียบางชนิดนั้นระยะนี้จะมีการเปลี่ยนแปลงด้านสรีรวิทยาหลายประการ โดยเฉพาะการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ สารพิษและเอกโซเอนไซม์ ต่าง ๆ ระยะที่ 4-6 prespore ที่มีเยื่อหุ้มชั้นเดียวห่อหุ้มจะถูกเยื่อหุ้มของเซลล์โอบล้อมขึ้นมาเรื่อย ๆ จนบรรจบกันทำให้ได้ prespore ที่มีเยื่อหุ้มสองชั้นระยะนี้มีการสร้างเอนไซม์หลายชนิด เพื่อนำไปใช้ในการสร้างสปอร์ เช่น อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส, กลูโคสดีไฮโดรจีเนส และอะโคนิเตส เป็นต้น ระยะที่ 7 เป็นระยะการสร้างสปอร์คอร์เทกซ์ โดย prespore จะมีการสะสมแคลเซียมเป็นจำนวนมาก การสร้างเอนไซม์ดีไฮโดรไดพิโคลินิกซินเธเทส และไดพิโคลินิกซินเธเทส เพื่อใช้สังเคราะห์กรดไดพิโคลินิกรวมทั้งมีการสังเคราะห์เอนไซม์อะดีโนซีนดีอะมิเนส และไรโบซิเดส เพื่อใช้เป็นกิจกรรมต่อไป ระยะที่ 8 เป็นระยะการสร้างสปอร์โค้ต จะมีน้ำน้อยกว่าเซลล์ปกติอย่างมากมาย ระยะนี้จะทนต่อสารเคมีต่าง ๆ และสามารถที่จะงอกเป็นเซลล์ใหม่ได้ ส่วนระยะที่ 9 เป็นระยะที่เจริญเต็มที่จะทนต่อความร้อนได้ดี ภายในสปอร์มีการสังเคราะห์เอนไซม์อะลานีนราซีเมส เพื่อใช้ในการงอกสปอร์ ในขณะที่ระยะที่ 10 จะเป็นระยะที่สปอร์หลุดออกจากเซลล์เป็นอิสระ (free spore) ซึ่งพร้อมจะงอกเป็นเซลล์ใหม่ต่อไปการสร้างสปอร์

ดังกล่าวมาแล้วจะใช้เวลาทั้งสิ้น 21-25 ชั่วโมง โดยในระยะเริ่มต้นจนถึงระยะที่สปอร์เจริญเต็มที่ใช้เวลาประมาณ 6-7 ชั่วโมง และระยะจากสปอร์เจริญเต็มที่จนถึงหลุดออกเป็นอิสระใช้เวลาประมาณ 15-18 ชั่วโมง การสร้างสปอร์เป็นกลไกเพื่อการอยู่รอดซึ่งขึ้นอยู่กับพันธุกรรมและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม สิ่งแวดล้อมมีทั้งภายนอกและภายในที่จำเป็นในการสร้างสปอร์ สภาพทางกายภาพ ได้แก่ ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของเซลล์ปกติ ช่วงของความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสมกับการเจริญของเซลล์ปกติ และออกซิเจนที่เพิ่มขึ้น (ในกรณีเป็นแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน เช่น *Bacillus*) (Santos, 2015)

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างสปอร์ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์มากมายทั้งในการเป็นอาหารเสริมของมนุษย์ อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ (Cutting, 2011) ซึ่งได้รับความนิยมเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขว้าง และมีการจดสิทธิบัตรถูกต้องตามมาตรฐานอาหาร (Galarza-Seeber et al., 2015) เพราะแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความสามารถในการทนต่อความร้อนในการประกอบอาหาร สภาพของความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร และเมื่อถูกปล่อยออกมานอกร่างกายก็ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม และเมื่อมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ สปอร์ก็จะมีการงอกและเจริญได้อย่างปกติ จากการทดลองในจานเพาะเชื้อ เมื่อแบคทีเรียที่ขาดแคลนสารอาหาร แบคทีเรียก็จะเข้าสู่การพัฒนาไปเป็นการสร้างสปอร์ใน 8 ชั่วโมงต่อมา (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 วงจรชีวิตของการสร้างสปอร์
ที่มา: Cutting (2011)

แผนผังแสดงวงจรชีวิตของการสร้างสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย ภายใต้สภาวะการขาดแคลนสารอาหารในการเจริญ โดยเซลล์ปกติ (VC) จะมีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาโดยเริ่มที่จะสร้าง forespore (F) ภายในเซลล์แม่ (MC) ของ sporangium หลังจากนั้นประมาณ 8 ชั่วโมง สปอร์ (S) จะถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ และมีการสลายของเซลล์แม่ (MC) และในทางตรงกันข้ามเมื่อมีสภาวะที่

เหมาะสมหรือในเซลล์ปกติก็จะมีการแบ่งตัวแบบ Binary fission เพื่อเพิ่มจำนวนและเจริญต่อไป โครงสร้างของสปอร์จะประกอบไปด้วย ชั้น Spore body (Core), ผนังสปอร์ (Spore wall), สปอร์คอร์เทกซ์ (Spore Cortex), สปอร์โค้ต (Spore Coat), เอกโซสปอเรียม (Exosporium) รวมทั้งส่วนของชั้นเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) และโครงสร้างของชั้นเยื่อหุ้มต่าง ๆ (ภาพที่ 2) ด้วยคุณสมบัติที่กล่าวมานี้ทำให้สปอร์จึงมีความสามารถในการทนต่อสภาวะต่าง ๆที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งสปอร์แต่ละชนิดก็จะมีขนาดและรูปร่างที่ต่างกันออกไป ทั้งรูปร่างกลม วงรี ซึ่งจะมีขนาดอยู่ในระหว่าง 0.8 ถึง 1.4 มิลลิเมตร และมีค่าประจุเป็นลบทำให้มีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งสปอร์ของแบคทีเรียจะพบใน 2 กลุ่มใหญ่คือกลุ่มของบาซิลลัส และแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศในกลุ่มคลอสทริเดียม แม้ว่าแบคทีเรียสปอร์จะพบได้ทั่วไปทั้งในดิน น้ำ และอากาศ แต่กลไกและกระบวนการทำงานต่าง ๆ ก็ยังเป็นที่ศึกษากันน้อยอยู่ในปัจจุบัน (Sella et al., 2014)

1.2.2. แหล่งธรรมชาติที่สามารถคัดแยก *Bacillus* sp.

สกุล *Bacillus* สามารถคัดแยกได้แหล่งจากธรรมชาติ ดังนี้

1.2.2.1 จากร่างกายมนุษย์ ในร่างกายของมนุษย์จะมีจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร ไม่ว่าจะเป็นลำไส้เล็กหรือลำไส้ใหญ่ หรือจากสารคัดหลั่งที่ออกมาจากร่างกาย เช่น น้ำนม และอุจจาระ เป็นต้น ที่ผ่านมามีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียสกุล *Bacillus* จากร่างกายมนุษย์ เช่น อุจจาระของทารก (Hong *et. al*., 2009), ระบบทางเดินอาหารมนุษย์ (Khaneja et. al., 2009) เป็นต้น

1.2.2.2 จากร่างกายสัตว์ ในร่างกายของสัตว์ไม่ว่าจะเป็น สัตว์ปีก สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง สัตว์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์น้ำ หรือแม้แต่สัตว์ทะเล (Pechenik, 2000) ก็จะมีจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารเช่นเดียวกับมนุษย์ ที่ผ่านมามีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียสกุล *Bacillus* จากสัตว์ เช่น สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Beleneva, 2008), ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก (Nguyen *et. al*., 2015), มูลสัตว์ (Sornplang and Piyadeatsoontorn, 2016), ระบบทางเดินอาหารของปลา (Chen et. al., 2015) เป็นต้น

1.2.2.3 จากสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นสิ่งแวดล้อมบนบก หรือในน้ำทั้งน้ำทะเล น้ำกร่อย และน้ำจืด ก็สามารถนำมาคัดแยกแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ได้ ที่ผ่านมามีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียสกุล *Bacillus* จากสิ่งแวดล้อม เช่น แยกได้จากน้ำทะเล ดินในบ่อเลี้ยงกุ้ง (Khaneja et. al., 2009) ดินบริเวณรากพืช (Boottanun et. al., 2017) น้ำพุร้อน (Mohammad et. al., 2017) น้ำทะเล (Gauthier et. al., 1976) ลำไส้กุ้ง (Kim et. al., 2020) เป็นต้น

นอกจากนี้แบคทีเรียสกุล *Bacillus* บางกลุ่มมีการสร้างสารสี และค้นพบกันอย่างแพร่หลายในธรรมชาติ (Chew and Bryant 2007; Coesl *et. al*., 2008 อ้างโดย Khaneja *et. al*.,

2009) โคโลนีโดยส่วนใหญ่มักจะเป็นสีเหลือง ส้ม ครีม ขาว และชมพู ซึ่งสายพันธุ์ที่พบมากที่สุด ได้แก่ *B. marisflavi, B. indicus, B. altitudinis* และ *B. safensis* สารสีทั้ง 3 สีนี้จะสามารถการดูดซับแคโรทีนอยด์สูงสุดที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 455, 467 และ 492 นาโนเมตร ตามลำดับ ซึ่งสามารถตอบสนองต่อการมองเห็นได้ อย่างไรก็ตามแคโรทีนอยด์ไม่สามารถทำให้มีสารสีอื่น ๆ ได้ นอกจากทั้ง 3 สีที่กล่าวถึงข้างต้น ซึ่งปรากฏให้เห็นมากที่สุดใน *Bacillus* (Khaneja *et. al*., 2009)

1.2.3. โพรไบโอติก (Probiotic)

โพรไบโอติกประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หลายชนิดซึ่งช่วยรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหารและป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคเจริญ โดยเมื่อสัตว์ได้รับโพรไบโอติกเข้าสู่ร่างกายแล้วโพรไบโอติกจะผ่านกระเพาะอาหารไปเจริญและแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะกับเยื่อบุทางเดินอาหารและมีการเพิ่มจำนวนบนเยื่อบุผนังลำไส้เล็กโดยแทรกตัวอยู่ระหว่างวิลไล จึงช่วยลดการเกาะกลุ่มและทำให้เกิดการขับเชื้อก่อโรคออกจากระบบทางเดินอาหาร (Nour et a*l.,* 2014) และการที่เป็นสิ่งแปลกปลอมจึงสามารถดึงดูดให้แมคโครฟาร์จเดินทางมามากมาย จึงเป็นการกระตุ้นให้มีระบบภูมิคุ้มกันเฉพาะแห่งได้ดีขึ้น นอกจากนี้ โพรไบโอติกยังสามารถสร้างสารต่อต้านแบคทีเรียก่อโรค เช่น แบคเทอริโอซิน (Guo et al., 2006) ทำให้สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคอื่นๆ ได้ เช่น *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella enterica, Streptococcus suis, Listeria monocytogenes* และ *Pasteurella multocida* (Gu et al., 2015)

จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่จะนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิตทั้งคนและสัตว์จะต้องคำนึงถึงเรื่องความปลอดภัย และประโยชน์ที่จะได้รับเป็นหลัก ดังนั้นหลักเกณฑ์สำคัญในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกควรมีคุณสมบัติหลัก ๆ ได้แก่ สามารถอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์หรือสัตว์ชนิดนั้น ๆ ได้ ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค สามารถเจริญเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารได้ และมีปริมาณสูงเพียงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ

1.2.4. กลไกการทำงานของโพรไบโอติก

กลไกการทำงานของโพรไบโอติกมีหลายกระบวนการร่วมกัน ได้แก่

1.2.4.1 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Antimicrobial activity) โดยโพรไบโอติกจะช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในทางเดินอาหาร มีกระบวนการต่าง ๆ เช่น ลดค่าความเป็นกรดเบสในท่อทางเดินอาหาร ปล่อยสารพวกเพปไทด์ยับยั้งการเจริญ ยับยั้งการแพร่ของแบคทีเรียขัดขวางการยึดเกาะของแบคทีเรียที่เซลล์บุผิว (Epithelial cells) (Tabbene et al., 2016)

1.2.4.2 การเพิ่มสิ่งขัดขวาง (Barrier function) โดยการสร้างสิ่งขัดขวางการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น จะช่วยลดปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ โดยอาศัยกระบวนการ เช่น เพิ่มการผลิตน้ำเมือก (Mucus) ทางเดินอาหาร (Lee et al., 2017)

1.2.4.3 การสร้างภูมิคุ้มกัน (Immunomodulation) โดยมีกระบวนการต่าง ๆ เช่น ระบบภูมิคุ้มกันบริเวณเซลล์บุผิวที่ชั้นเยื่อบุผิวในลำไส้ ให้มีความแข็งแรงป้องกันการติดเชื้อหรือการอักเสบ การมีอิทธิพลต่อการสร้างภูมิต้านทาน ทั้งเม็ดเลือดขาวชนิด Monocytes หรือ Macrophage และยังมีอิทธิพลต่อการสร้างภูมิต้านทาน เม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocytes (Wang et al., 2018)

1.2.4.4 การยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial effect) การทำงานของโพรไบโอติก เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์อื่น โดยกระบวนการสร้างสารที่เป็นปัจจัยต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น เช่น การสร้างกรดแล็กติก กรดไขมันสายสั้น ๆ ทำให้มีความเป็นกรดมากขึ้นในระบบทางเดินอาหาร ทำให้ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น แบคทีเรียโพรไบโอติกยังผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค รวมถึงแบคทีเรียโพรไบโอติกยังสามารถแข่งขันแย่งพื้นที่เกาะยึดในผนังลำไส้กับเชื้อก่อโรคด้วยกระบวนการยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น การผลิตสารที่เป็นปัจจัยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Production of Antimicrobial Factors) โพรไบโอติกสามารถผลิตกรดไขมันสายสั้น ๆ (Fatty acid) ทำให้ลดการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค (Vandenbergh et al., 1993) แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) เป็นสารที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น โดยออกฤทธิ์จะมีผลยับยั้งแบคทีเรียเฉพาะกลุ่มที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่สร้าง *Lactobacilli* ซึ่งสามารถผลิตสารประกอบที่ยับยั้งการเพิ่มจำนวน และทำงานของไวรัสได้ *Lactobacillus rhamnosus* และ *Lactobacillus fermentum* สามารถผลิตสารยับยั้ง Adenovirus และ Vesicular stomatitis virus (Rossland et al., 2005) และกลุ่มของ *Bacillus* spp. ผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ surfactin (Santos et al., 2018), fengycin, iturin (Fan et al., 2017) เป็นต้น

1.2.4.5 การแข่งขันในการยึดเกาะ (Competition of Adhesion) เป็นการเข้ายึดเพิ่มจำนวนของโพรไบโอติกด้วยการแข่งขันพวกจุลินทรีย์ก่อโรคในการแย่งยึดเกาะ *Lactobacillus* GG, *L. plantarum* และกลุ่มของ *Bacillus* spp. มีการแข่งขันยับยั้งการเกาะติดผนังลำไส้ของ *E. coli* (Mack et al., 1999) นอกจากนี้ยังขัดขวางตำแหน่งเข้าจับเชื้อโรคได้ด้วย

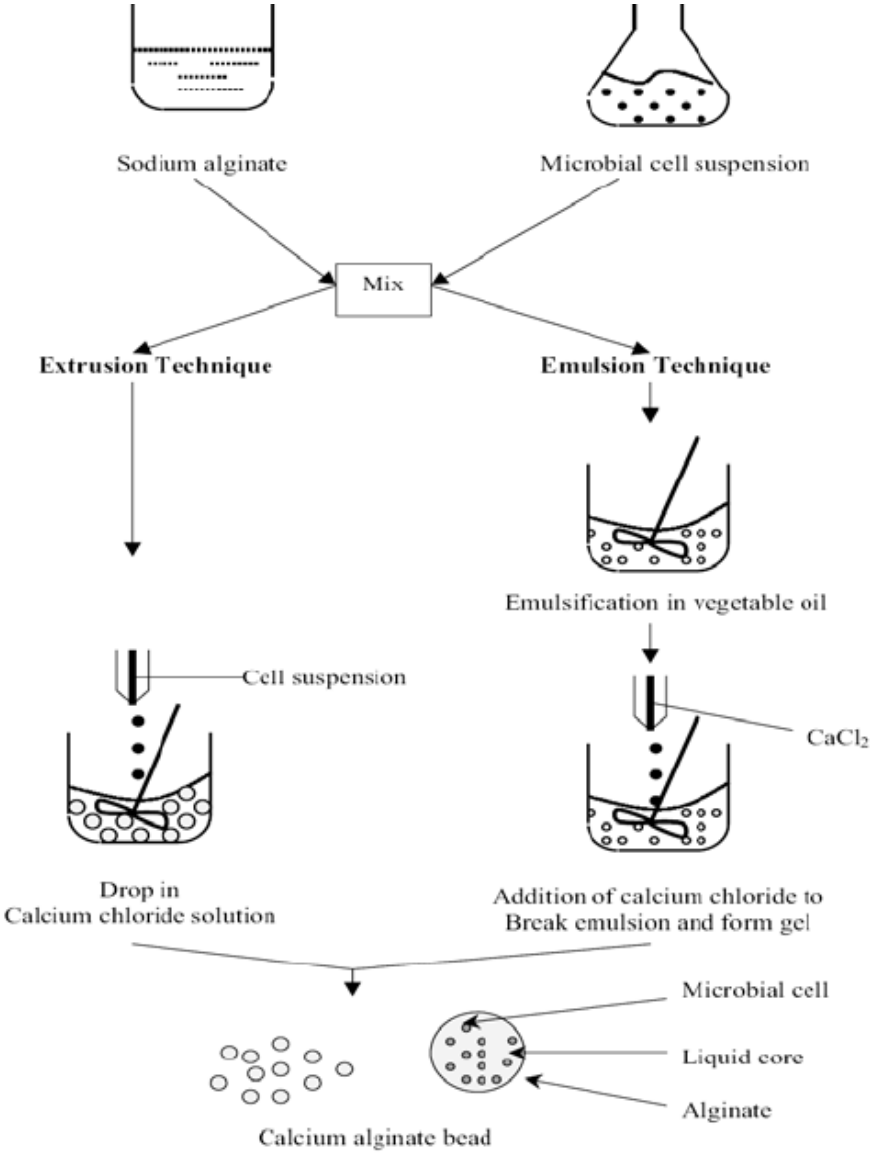
1.2.5. การห่อหุ้มโพรไบโอติกในเม็ดเจล (Microencapsulation)

การห่อหุ้มเซลล์เป็นวิธีการที่ช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในทางเดินอาหาร และสภาวะที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ของแบคทีเรีย โดยสามารถช่วยป้องกันแบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมภายในเซลล์ เมื่อต้องอยู่กับอาหารที่มีสภาวะไม่เหมาะสมต่อการรอดชีวิต และการห่อหุ้มช่วยให้เชื้อรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารที่มีสภาวะเป็นกรดสูง ในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดีในลำไส้เล็กได้

ดีขึ้นและเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน โดยการห่อหุ้มหรือตรึงเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการไว้ในวัสดุตรึง สารที่ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรีย เช่น แคลเซียมแอลจิเนต (Calcium alginate) โซเดียมแอลจิเนต (Sodium alginate) คาร์ราจีแนน (Carrageenan) และเจลาติน (Gelatin) เป็นต้น เทคนิคในการทำ microencapsulation ที่ประยุกต์ใช้กับโพรไบโอติกได้คือ extrusion technique เป็นวิธีการดั้งเดิมและใช้กันทั่วไปในการทำเม็ดเจลด้วย hydrocolloid ทำโดยการเตรียมสารละลาย hydrocolloid แล้วจึงเติมเซลล์แบคทีเรียลงไปผสมให้เข้ากัน และใช้วิธีการปล่อย suspension ของเซลล์ผ่านหัวเข็มฉีดยาให้มีลักษณะเป็นหยด ลงไปในสารละลายสำหรับทำให้เจลแข็งตัว (ภาพที่ 4) ซึ่งขนาดและรูปร่างของเม็ดเจลขึ้นกับเส้นผ่านศูนย์กลางของเข็มฉีดยาที่ใช้และความสูงของการหยดสารแขวนลอยของเซลล์ลงในสารละลายสำหรับทำให้เจลแข็งตัว วิธีนี้ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ซับซ้อน ต้นทุนในการผลิตต่ำ และส่วนผสมที่ใช้มีสภาวะที่ไม่รุนแรง เซลล์แบคทีเรียจึงมีอัตราการรอดชีวิตได้สูง และ emulsion technique เป็นเทคนิคที่ใช้การเติมสารแขวนลอยของจุลินทรีย์ที่ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเล็กน้อยลงในน้ำมันพืชที่มีปริมาตรมากกว่า น้ำมันพืชที่ใช้ ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันทานตะวัน น้ำมันคาโนล่าหรือน้ำมันข้าวโพด เป็นต้น ส่วนผสมจะถูกตีปั่นจนอยู่ในรูป water in oil emulsion จากนั้นจึงเติมสารละลายสำหรับทำให้เจลแข็งตัวลงไป ซึ่งส่วนใหญ่แล้วนั้นจะใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เป็น hardening solution ขนาดของเม็ดเจลที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับความเร็วในการตีปั่น โดยแคปซูลที่ได้จะมีขนาดตั้งแต่ 25 ไมโครเมตร ถึง 2 มิลลิเมตร วัสดุตัวพยุงที่นิยมใช้จะมีหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ แอลจิเนต ส่วนผสมของคาร์ราจีแนน เซลลูโลสอะซีเทตทาเลต และเจลาติน เป็นต้น ซึ่งวัสดุตัวพยุงจะมีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป เช่น แอลจิเนตจะเป็นสารที่สกัดได้จากสาหร่ายหลายสปีชีส์ และการศึกษาโดยทั่วไปจะใช้แอลจิเนตที่ความเข้มข้น 1-2 เปอร์เซ็นต์ และทำให้แข็งตัวในแคลเซียมคลอไรด์ 0.05-1.5 โมลาร์ คาร์ราจีแนน เป็นโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเลขนาดใหญ่ โดยทั่วไปใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร (Krasaekoopt et al., 2004)

เนื่องจากมีความนิยมในการเสริมโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหาร จึงมีการศึกษาเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกโดยการห่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นการป้องกันเซลล์จากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม Phoem และคณะ (2015) ศึกษาการห่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียโดยใช้วิธี emulsion techniques เพื่อศึกษาการรอดชีวิตของ *Bifidobacterium longum* ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตในสภาวะที่สัมผัสกับน้ำย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้ โดยใช้สารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากหอมแดงมาผสมสารละลายของแบคทีเรีย พบว่า *B. longum* ที่มีสารสกัดจากหอมแดงสามารถทนต่อค่า pH ที่ต่ำของกรดในกระเพาะอาหารและลำไส้ได้ดีกว่าเซลล์อิสระที่ไม่ได้มีการห่อหุ้มเซลล์ และอัตราการรอดชีวิตของ *B. longum* หลังจากทดสอบ พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าเซลล์อิสระ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า *B. longum* ที่หุ้มด้วยไมโครแคปซูลกับสารสกัดจากหอมแดงมี

ประสิทธิภาพในการส่งโพรไบโอติกไปสู่ลำไส้และสามารถรักษาเซลล์แบคทีเรียให้อยู่รอดในผลิตภัณฑ์อาหารได้



ภาพที่ 4 การห่อหุ้มโพรไบโอติกในเม็ดเจล

ที่มา: Krasaekoopt et al. (2004)

เทพอนันต์ และคณะ (2559) ศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ห่อหุ้มด้วยแคลเซียมแอลจิเนต ในโยเกิร์ตนมข้าวโพด โยเกิร์ตนมวัว และโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำผลของการห่อหุ้มเซลล์ต่อการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติก จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1043, *Lactobacillus casei* TISTR 1463 และ

Lactobacillus rhamnosus TISTR 047 ในโยเกิร์ตนมข้าวโพด โยเกิร์ตนมวัว และโยเกิร์ตนมถั่วเหลือง เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน เมื่อตรวจสอบปริมาณกรดทั้งหมดของโยเกิร์ตนมข้าวโพด โยเกิร์ตนมวัว และโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองที่เติมเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยแคลเซียมแอลจิเนต พบว่ามีปริมาณกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บรักษา ค่าความเป็นกรด-เบสลดลง การรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 3 สายพันธุ์ในโยเกิร์ตมีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตลอดอายุการเก็บรักษาและมีปริมาณเชื้อรอดชีวิตสูงกว่า 10^7 CFU/g การเติมเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยแคลเซียมแอลจิเนตไม่มีผลต่อเนื้อสัมผัส สี กลิ่น และรสชาติของโยเกิร์ตระหว่างการเก็บรักษาในตู้เย็น

นอกจากนี้ยังมีการเสริมโพรไบโอติกในการเลี้ยงสัตว์และได้มีการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของโพรไบโอติกโดยการห่อหุ้มเซลล์ เมื่ออยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ มังกร และอุไรลักษณ์ (2556) ได้พัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกสำหรับกุ้ง โดยใช้ *Lactobacillus plantarum* LP64 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกสำหรับกุ้ง และหุ้มด้วยแอลจิเนตเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิต จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมแอลจิเนต 1.5, 2.0 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ และความเร็วการกวน 400, 600 และ 800 รอบต่อนาที ต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเม็ดแบคทีเรีย และปริมาณของเซลล์รอดชีวิตของแบคทีเรียที่หุ้มได้ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการหุ้มแบคทีเรียด้วยวิธี emulsion techniques คือ สารละลายโซเดียมแอลจิเนตความเข้มข้น 3.0 เปอร์เซ็นต์ และความเร็วการกวน 800 รอบต่อนาที ซึ่งให้ค่าประสิทธิภาพการหุ้มเซลล์และปลดปล่อยเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดถึง 96.57 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเซลล์เริ่มต้น

Wang และคณะ (2018) ศึกษาผลของการเสริมโพรไบโอติกและพรีไบโอติกแบบแคปซูลต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ระบบภูมิคุ้มกัน และจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่เนื้อ โดยใช้ *Enterococcus faecium* (1×10^8 CFU/กรัม) *Lactobacillus plantarum* (1×10^8 CFU/กรัม) และ *Bacillus subtilis* (1×10^9 CFU/กรัม) ห่อหุ้มร่วมกับพรีไบโอติก β-mannose และ fructo-oligosaccharide โดยเสริมไมโครแคปซูลปริมาณ 2 กรัมต่ออาหารไก่ 1 กิโลกรัม ทดสอบเป็นเวลา 42 วัน พบว่าช่วยเพิ่มระดับอิมมูโนโกลบูลิน IgA, IgM, IL-2 และ IL-6 และเพิ่มระดับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และช่วยเพิ่มแบคทีเรียกรดแล็กติกในระบบทางเดินอาหาร จากผลการทดลองสามารถใช้เป็นทางเลือกที่มีศักยภาพในการใช้เสริมในอาหารไก่ได้

1.2.6. ระบบทางเดินอาหารของไก่

ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีกต่างจากระบบทางเดินอาหารของสัตว์กระเพาะเดี่ยว โดยมีส่วนที่เป็นกระเพาะอยู่ถึง 3 กระเพาะ สัตว์ปีกจะกินอาหารโดยไม่ได้เคี้ยว ซึ่งส่วนประกอบของระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก (ภาพที่ 5) มีดังนี้

1.2.6.1 ปาก (Beak) สัตว์ปีกจะไม่มีริมฝีปาก กระพุ้งแก้ม และฟัน โดยปากของสัตว์ปีกจะเป็นจงอยที่แหลมคม ภายในจะไม่มีฟัน ใช้จงอยปากจิกอาหารกลืนลงกระเพาะโดยไม่ต้องเคี้ยว ลิ้นมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยม ทำหน้าที่ช่วยในการกลืนอาหาร

1.2.6.2 หลอดอาหาร (Esophagus) เป็นท่อกล้ามเนื้อทำหน้าที่ในการลำเลียงอาหารจากปากไปยังกระเพาะพักก่อนจะทำการย่อยในกระเพาะจริง ซึ่งตอนปลายของหลอดอาหารจะขยายออกเกิดเป็นกระเพาะพัก

1.2.6.3 กระเพาะพัก (Crop) ซึ่งจะมีอยู่ในสัตว์ปีกเกือบทุกชนิด เป็นที่พักอาหารเมื่อสัตว์กินอาหารเข้ามา ระยะเวลาที่อาหารอยู่ในกระเพาะพักขึ้นอยู่กับขนาด ชนิด ปริมาณอาหารที่กินและปริมาณอาหารที่อยู่ในกระเพาะบด เป็นส่วนของหลอดอาหารที่ขยายออกสำหรับเป็นที่เก็บอาหารระยะแรกและทำให้อาหารอ่อนนุ่ม ในกระเพาะพักไม่มีการสร้างเอนไซม์แต่มีเอนไซม์อะไมเลส จากปากทำหน้าที่ในการย่อยแป้งต่อไป

1.2.6.4 กระเพาะจริง (Proventriculus) จะต่ออยู่ด้านหลังของกระเพาะพัก และเป็นบริเวณที่มีต่อมต่าง ๆ อยู่มากมาย ทำหน้าที่ขับน้ำย่อยออกมาผสมกับอาหาร และทำหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์เพปซิน และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) มีค่า pH ประมาณ 2 มาช่วยย่อยอาหาร

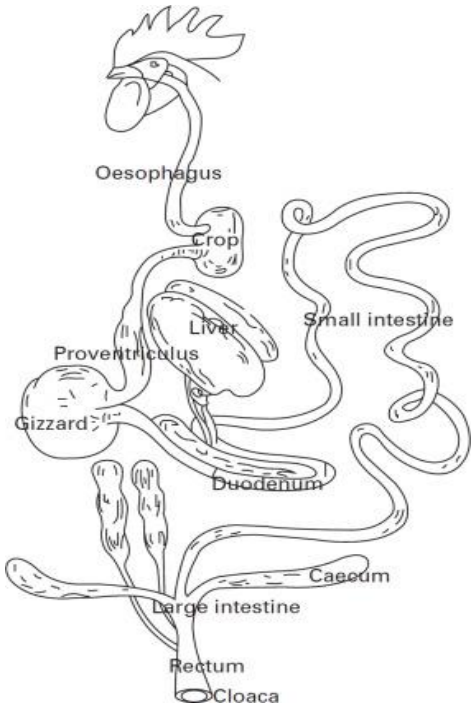
1.2.6.5 กระเพาะบดหรือกึ๋น (Gizzard) อยู่ถัดจากกระเพาะจริง เป็นอวัยวะที่มีผนังหนาและกล้ามเนื้อที่แข็งแรง ทำหน้าที่บดอาหารให้ละเอียดแทนการเคี้ยวด้วยฟัน บริเวณกระเพาะส่วนนี้จะไม่มีการหลั่งเอนไซม์

1.2.6.6 ลำไส้เล็ก (Small intestine) เป็นอวัยวะท่อทางเดินอาหารที่ต่อจากกึ๋นไปสู่ลำไส้ใหญ่จะแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนต้น (Duodenum) มีลักษณะโค้งเป็นห่วง เรียกว่า Duodenal loop ที่ยึดกับตับอ่อน (Pancreas) โดยตับอ่อนจะทำหน้าที่ในการผลิตน้ำย่อย (Pancreatic juice) เข้าสู่ลำไส้เล็ก ส่วนกลาง (Jejunum) และส่วนปลาย (Ilium) ลำไส้เล็กช่วยย่อยสารอาหารประเภทโปรตีน คาร์โบไฮเดรท และไขมัน

1.2.6.7 ไส้ติ่ง (Ceca) ในสัตว์ปีกเกือบทุกชนิดมีไส้ติ่ง 2 อัน มีลักษณะเป็นถุงคู่ ยาวประมาณ 6 นิ้ว โดยจะเชื่อมต่อกับทางเดินอาหารบริเวณรอยต่อระหว่างลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ เป็นบริเวณที่เกิดการหมัก และย่อยเยื่อใยในอาหารโดยแบคทีเรีย

1.2.6.8 ลำไส้ใหญ่ (Large intestine) จะอยู่ถัดมาจากลำไส้เล็ก และสิ้นสุดที่ทวารร่วม มีความยาวประมาณ 10 เซนติเมตร จะมีการดูดซึมน้ำและแร่ธาตุออกจากกากอาหารเข้าสู่ร่างกาย ทำให้กากอาหารแห้ง และขับถ่ายออกทางทวารร่วม

1.2.6.9 ทวารร่วม (Cloaca) เป็นส่วนปลายที่สิ้นสุดของระบบทางเดินอาหาร ซึ่งจะเป็นท่อร่วมระหว่างระบบขับถ่าย และระบบสืบพันธุ์



ภาพที่ 5 ระบบทางเดินอาหารของไก่
ที่มา: (Biavati and Santini, 2007)

1.2.8. จุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normal flora) ในระบบทางเดินอาหารไก่

ทางเดินอาหารของไก่ประกอบด้วยจุลินทรีย์หลายชนิดและมีการดำรงชีวิตอย่างเป็นระบบ ลูกไก่ที่ฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ นั้นทางเดินอาหารยังปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ในช่วงอายุ 1 สัปดาห์แรก เมื่อลูกไก่ได้กินอาหารหรือวัสดุรองพื้นก็จะได้รับจุลินทรีย์เข้าไป ทำให้เกิดการเจริญและพัฒนาของจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ดำรงชีวิตโดยไม่ใช้ออกซิเจน (Anaerobic flora) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม Coliforms และ *Enterococcus* หลังจากนั้นจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus* จะมีการเจริญมาแทนที่และกลายเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่อาศัยในทางเดินอาหาร นอกจากนี้พบว่าทางเดินอาหารแต่ละส่วนของไก่ประกอบด้วยจุลินทรีย์แตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ในส่วนของลำไส้เล็กตรวจพบ

จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* sp. แบคทีเรียกรดแล็กติกและจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Enterococcus* โดยพบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* sp. จะมีปริมาณมากที่สุดในลำไส้เล็กส่วนปลายโดยเฉลี่ย 10^{12}-10^{15} CFU/กรัม และในมูลไก่ประมาณ 10^{8}-10^{11} CFU/กรัม (ธวัชชัย และคณะ, 2547) โดยปริมาณและชนิดของแบคทีเรียที่พบภายในทางเดินของไก่ขึ้นอยู่กับค่า pH ในแต่ส่วนของอวัยวะภายในของไก่ด้วย เนื่องจากทางเดินอาหารของไก่มีหลายส่วนทำให้มีค่า pH ที่แตกต่างกันออกไป ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าความเป็นกรดเบส (pH) ในระบบทางเดินอาหารของไก่

อวัยวะในระบบทางเดินอาหาร	pH
กระเพาะพัก	4.00-6.30
กระเพาะจริง	3.17-4.80
กระเพาะบด	2.50-4.75
ลำไส้เล็กส่วนต้น	5.70-6.00
ลำไส้เล็กส่วยปลาย	6.30-6.40
ไส้ตรง	6.30-6.40
ไส้ติ่งหรือไส้ตัน	5.70-8.40
ทวารรวม	5.40-8.40

ที่มา : Sturkie (1976) อ้างโดย หทัยรัตน์ (2551)

Luckey (1972) กล่าวว่ามีแบคทีเรียในทางเดินอาหารมนุษย์และสัตว์ประมาณ 10^{14} CFU นอกจากนี้แบคทีเรียที่พบในทางเดินอาหารของสัตว์ (ตารางที่ 2) เช่น สัตว์เคี้ยวเอื้อง สุกร สัตว์ปีก มีประชากรแบคทีเรียประมาณ 400 ชนิด และแบคทีเรียบางชนิดทำให้เกิดโรคได้ แต่ในภาวะปกติแบคทีเรียเหล่านี้อยู่ในภาวะสมดุล สัตว์จะแข็งแรงไม่เจ็บป่วย แต่เมื่อใดที่แบคทีเรียในร่างกายสัตว์ไม่สมดุลจะทำให้สัตว์ป่วยได้ ความสัมพันธ์ระหว่างเจ้าบ้านกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นผู้อาศัย จะเป็นประโยชน์หรือเกิดโทษต่อร่างกายนั้น ขึ้นกับหลายปัจจัย ร่างกายของเจ้าบ้านจะเป็นแหล่งอาหารและที่อยู่ ส่วนจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่ยึดครองพื้นที่ส่วนต่าง ๆ ของร่างกายจะเป็นเจ้าถิ่นป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ภายนอกอื่นเข้าสู่ร่างกาย นอกจากนี้จุลินทรีย์ประจำถิ่นยังมีส่วนช่วยร่างกายเจ้าบ้านทำหน้าที่ต่าง ๆ เช่น การย่อยอาหาร หรือสังเคราะห์สารอาหารที่เป็นประโยชน์ทั้งต่อตัวจุลินทรีย์ประจำถิ่นและเจ้าบ้านด้วย แต่หากสภาวะความสัมพันธ์เสียสมดุลไป จุลินทรีย์ประจำถิ่นอาจถูกรุกรานโดยเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจากภายนอกร่างกาย หรือตัวของจุลินทรีย์ประจำถิ่นเองอาจเป็นผู้ก่อโรคก็ได้ ผลของการเสียสมดุลนี้จะทำให้ร่างกายของเจ้าบ้านเจ็บป่วยไม่แข็งแรง และจุลินทรีย์ประจำถิ่นบางชนิดที่ฉวยโอกาสจะทำให้เกิดโรคเมื่อความต้านทานของร่างกายลดลง

ตารางที่ 2 แบคทีเรียประจำถิ่นที่พบในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง สุกร สัตว์ปีก

สัตว์เคี้ยวเอื้อง	**สุกร**	**สัตว์ปีก**
Bacteroides amylophilus	*Bacteroides ruminicola*	*Bacteroides* spp.
Bacteroides ruminicola	*Bacteroides uniformis*	*Bacteroides fragilis*
Bacteroides succinogenes	*Bacteroides succinogenes*	*Bifidobacterium bifidus*
Butyrivibrio fibrisolvens	*Butyrivibrio fibrisolvens*	*Clostridium perfringens*
Clostridium welchii	*Clostridium perfringens*	*Clostridium beijerinckii*
Escherichia coli	*Escherichia coli*	*Clostridium* spp.
Lachnospira multiparus	*Eubacterium aerofaciens*	*Eubacterium* spp.
Lactobacillus spp.	*Lactobacillus acidophilus*	*Fusobacterium* spp.
Methanobacterium mobilis	*Lactobacillus brevis*	*Gemmiger formicilis*
Methanobacterium ruminantium	*Lactobacillus cellobiosus*	*Lactobacillus acidophilus*
Peptostreptococus elsdenii	*Lactobacillus fermentum*	*Lactobacillus fermentum*
Ruminococcus albus	*Lactobacillus salivarius*	*Lactobacillus salivarius*
Ruminococcus flavefaciens	*Veillonellae* spp.	*Micrococcus* spp.
Selenomonas ruminantium	*Bacillus* spp.	*Streptococus fecium*
Streptococus faecalis	*Ruminococcus flavefaciens*	*Streptococus faecalis*
Streptococus fecium	*Selenomonas ruminantium*	*Ruminococcus obeum*
Streptococus bovis	*Streptococus bovis*	*Bacillus* spp.
Succinimonas amylolytica	*Streptococus equinus*	
Succinovibrio dextrinosolvens	*Streptococus faecalis*	
Treponema spp.	*Streptococus salivarius*	

ที่มา: Luckey (1972)

1.2.9. จุลินทรีย์ในบ่อกุ้ง

ในธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ จะมีจุลินทรีย์มากมายหลายชนิดซึ่งแต่ละชนิดจะแพร่พันธุ์ และเพิ่มปริมาณภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีความแตกต่างกัน ระหว่างประชากรของจุลินทรีย์แต่ละชนิดก็มีการแข่งขันในการเพิ่มจำนวนและควบคุมปริมาณประชากรของแต่ละชนิด โดยมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละชนิดเป็นตัวส่งเสริมการเจริญเพื่อเพิ่มจำนวน จุลินทรีย์สามารถเจริญแพร่พันธุ์และเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วภายในเวลาเพียงไม่กี่ชั่วโมงเท่านั้น แต่ในบ่อ

เลี้ยงกุ้งจุลินทรีย์จะมีช่วงชีวิตสั้น เนื่องจากความลึกของบ่อที่แสงอาทิตย์ส่องไปไม่ถึงก้นบ่อ เมื่อขยายพันธุ์ขึ้นอย่างรวดเร็วก็จะตายภายในเวลา 7-10 วัน เมื่อตายไปก็จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างสปอร์ได้จะเกิดการสร้างสปอร์ขึ้น จากนั้นตกลงสู่ก้นบ่อเลี้ยงเพื่อรอเวลา สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และสปอร์จะเจริญแพร่พันธุ์ไปเป็นเซลล์ปกติและเพิ่มปริมาณขึ้น ทำให้ดินในบ่อเลี้ยงกุ้งนั้นเต็มไปด้วยสปอร์จุลินทรีย์มากมายหลายชนิด (Gobi et al., 2018)

Tepaamorndech และคณะ (2019) ได้คัดแยกและศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง สามารถคัดแยก *B. aryabhattai* TBRC8450 ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Vibrio harveyi* และ *V. parahaemolyticus* เมื่อเสริมเป็นโพรไบโอติกให้กับกุ้งขาว พบว่าช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิต กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

1.2.10. การเสริมโพรไบโอติกในการเลี้ยงไก่

จุลินทรีย์โพรไบโอติกส่วนใหญ่จะมีความจำเพาะเจาะจงในการเจริญในทางเดินอาหารของสัตว์ที่เป็นแหล่งที่มาของเชื้อ (Host specificity) แต่ก็มีบางชนิดที่สามารถเติบโตในสัตว์ต่างชนิดกันได้ แต่โพรไบโอติกที่ใช้ในปัจจุบันจะมีจุลินทรีย์หลายชนิดผสมกันอยู่หรืออาจเป็นโพรไบโอติก ชนิดเดียวและอาจอยู่ในรูปผงเม็ด หรือรูปแป้งเปียก การให้สัตว์กินอาจจะทำโดยการกรอกให้สัตว์กินโดยตรง หรือผสมกับอาหารและเติมลงในน้ำ คุณสมบัติของโพรไบโอติกที่ดีจะต้องสามารถมีชีวิตอยู่ในสภาพการเก็บรักษาตามปกติ และสามารถคงอยู่ในทางเดินอาหารสัตว์ มีความทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร ทนต่อน้ำดี รวมทั้งต้องมีคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่อตัวสัตว์ด้วย การใช้โพรไบโอติกในบางกรณีต้องมีการใช้ซ้ำหลายครั้ง หรือให้กินติดต่อกันไประยะหนึ่งเพื่อให้จุลินทรีย์สามารถตั้งถิ่นฐานในทางเดินอาหารสัตว์ได้อย่างถาวร การยึดเกาะผิวของลำไส้เป็นคุณสมบัติหนึ่งของโพรไบโอติกที่สำคัญ ทั้งนี้เนื่องจากการยึดเกาะผิวของลำไส้ของโพรไบโอติกมีความสัมพันธ์กับการกระตุ้นระบบควบคุมความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ และยับยั้งการยึดเกาะลำไส้ของเชื้อก่อโรค ซึ่งผลที่เกิดขึ้นทั้งหมดจะช่วยในการส่งเสริมและเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของตัวสัตว์ จุลินทรีย์ต้องไม่มีคุณสมบัติในการถ่ายทอดพันธุกรรมการต้านยา ช่วยย่อยกากอาหารแล้วให้ผลผลิตเป็นกรดอะมิโน กรดไขมัน วิตามิน และมีช่วงการเจริญในช่วงอุณหภูมิที่กว้างคือช่วงระหว่าง 20-60 องศาเซลเซียส (Hong et al., 2004)

การนำโพรไบโอติกมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์อาจใช้ในรูปสายพันธุ์เดี่ยวหรือสายพันธุ์ผสม โดยใช้ในรูปแบบผงที่บรรจุแคปซูล แกรนูล ในรูปเซลล์เปียก เชื้อสด หรือสปอร์ โดยป้อนให้สัตว์ทางปากโดยตรงหรือผสมลงในอาหารและน้ำดื่ม รวมทั้งสามารถนำมาใช้ในรูปแบบของสเปรย์พ่นรอบพื้นที่โรงเรือนเพื่อปรับสภาพแวดล้อมของจุลินทรีย์ในโรงเรือน (Fuller, 1992 อ้างโดย กาญจนา, 2556)

Nguyen และคณะ (2015) ศึกษาผลของการเสริม *Bacillus subtilis* CH16 ที่คัดแยกจากระบบทางเดินอาหารของไก่ เพื่อเป็นสารเสริมโพรไบโอติกต่อการเพิ่มน้ำหนักของไก่เนื้อ โดยเสริมสปอร์ของ *B. subtilis* CH16 ผสมในอาหารไก่ปริมาณมากกว่า 3×10^9 CFU/กรัม ทดลองเป็นเวลา 45 วัน ผลการทดลองพบว่าไก่เนื้อกลุ่มที่เสริมโพรไบโอติก *Bacillus subtilis* CH16 มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยเพิ่มขึ้น และมีค่า FCR น้อยกว่า และมีปริมาณ *Salmonella typhimurium*, *Escherichai. coli* และ *Clostridium perfringens* ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก *B. subtilis* CH16 นอกจากนี้ยังพบว่าสปอร์ของ *B. subtilis* CH16 มีอัตราการรอดชีวิตสูงเมื่ออยู่ในอาหาร

Guo และคณะ (2016) ศึกษาผลกระทบระยะยาวของการเสริม *B. subtilis* CGMCC 1.921 ต่อคุณภาพของไข่ และจุลินทรีย์ประจำถิ่นของไก่ไข่ โดยใช้ไก่ไข่สายพันธุ์ไฮไลน์บราวน์ ทดลองเป็นเวลา 24 สัปดาห์ พบว่าการเสริม *B. subtilis* CGMCC 1.921 การผลิตไข่มีแนวโน้มดีขึ้น ช่วยปรับปรุงคุณภาพไข่ให้ดีขึ้น โดยเฉพาะในด้านความแข็งแรงของเปลือกไข่ ตั้งแต่ 8 สัปดาห์เป็นต้นไป และยังช่วยลดปริมาณของเชื้อที่ก่อให้เกิดอาการท้องเสียอย่าง *E. coli* และ *C. perfringens* ในลำไส้และในมูล นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มปริมาณ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ในลำไส้และในมูลได้อีกด้วย

Yang และคณะ (2017) ศึกษาผลการเสริม *Bacillus* sp. สองชนิดต่อสมรรถภาพการเจริญ และลักษณะจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่ *Bacillus* sp. สองชนิด คือ *Bacillus licheniformis* และ *B. subtilis* ในอัตราส่วนต่างกันผสมกับอาหาร พบว่าการเสริม *B. licheniformis* และ *B. subtilis* ในอัตราส่วน $6.6 \times 10^5 : 3.3 \times 10^5$ มีผลทำให้น้ำหนักตัวเฉลี่ยต่อวันของไก่เพิ่มขึ้น อัตราการกินอาหารลดลง *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* sp. ในลำไส้ใหญ่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและจำนวนของ *E. coli* และ *Salmonella* sp. ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

Tang และคณะ (2017) ศึกษาผลของการเสริม *Bacillus amyloliquefaciens* ต่อสมรรถภาพการผลิตไข่ของไก่ไข่ โดยนำเชื้อในรูปแบบผงมาผสมกับอาหารในปริมาณ 1×10^7 และ 1×10^8 CFU/กิโลกรัม พบว่าในช่วง 4-6 สัปดาห์ไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริม *B. amyloliquefaciens* มีผลผลิตไข่มากกว่าไก่ที่ไม่ได้เสริม *B. amyloliquefaciens* ความแข็งแรงของเปลือกไข่และความหนาของเปลือกไข่เพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 และ 6 สัปดาห์ จำนวน *Lactobacillus* เพิ่มขึ้น ส่วนลำไส้เล็กส่วนต้นปริมาณของ *E. coli* และ *Salmonella* ลดลง ในกลุ่มที่เสริม *B. amyloliquefaciens* สรุปได้ว่าการเสริม *B. amyloliquefaciens* ในอาหารไก่มีผลดีต่อประสิทธิภาพในการผลิตไข่

Tang และคณะ (2019) ศึกษาผลของการเสริม *B. amyloliquefaciens* yb214245 และ *B. subtilis* yb-114246 ในอาหารไก่ไข่สายพันธุ์ไฮไลน์บราวน์อายุ 60 สัปดาห์ เป็นเวลา 84 วัน พบว่าการเสริมด้วย *Bacillus* ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการวางไข่ของแม่ไก่อย่างมีนัยสำคัญ ความแข็งแรงของเปลือกไข่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ระดับของคอเลสเตอรอลในไข่

แดงลดลง จำนวนแบคทีเรีย (*Bacillus, Lactobacillus* และ *Bifidobacterium*) ในลำไส้ใหญ่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้จำนวนของ *E. coli* และ *Salmonella* ลดลง สามารถสรุปได้ว่าการเสริม *Bacillus* ในอาหารไก่ ช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการเติบโต แบคทีเรียในลำไส้ คุณภาพไข่และสัณฐานวิทยาของลำไส้ไก่ให้ดีขึ้น

1.2.11. ประโยชน์ของโพรไบโอติกในกระบวนการผลิตสินค้าปศุสัตว์

ปัจจุบันมีการให้ความสำคัญและคำนึงถึงความปลอดภัยของอาหาร (Food safety) อย่างแพร่หลายทั้งในผู้ผลิตและผู้บริโภค รวมทั้งยังเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่ออุตสาหกรรมการผลิตการค้าทั้งในด้านของการเพิ่มมูลค่าและความต้องการของอาหาร โดยอาหารที่มีคุณภาพดีมีความปลอดภัยก็จะเป็นที่ต้องการ และสามารถขายได้ในตลาดโดยใช้ราคาที่สูงขึ้น นอกจากนี้ปัญหาด้านความปลอดภัยทางอาหาร เช่น การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารยังเป็นปัญหาหลักที่ถูกใช้ในการกีดกันทางการค้าระหว่างประเทศ ทำให้ความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เป็นสิ่งที่สำคัญ ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่าการใช้โพรไบโอติกในกระบวนการผลิตและการเลี้ยงสัตว์มีส่วนช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะทำให้เกิดสมดุลในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ ลดการเกาะติดผนังลำไส้ของจุลินทรีย์ก่อโรค เป็นการเพิ่มสัดส่วนและจำนวนของจุลินทรีย์ที่ดี มีประโยชน์ในทางเดินอาหารของสัตว์ ซึ่งทำให้สามารถระบุถึงประโยชน์ของการใช้โพรไบโอติกในด้านความปลอดภัยของกระบวนการผลิตและความปลอดภัยของสินค้าปศุสัตว์ได้ เช่น ช่วยลดปริมาณของจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ โพรไบโอติกสามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิดซึ่งช่วยในการย่อยอาหารของสัตว์ ลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคเมื่อเข้าสู่กระบวนการผลิต การแปรรูปผลิตภัณฑ์จากสัตว์ และลดการส่งผ่านของจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารจากสัตว์มาสู่คน ซึ่งปัจจุบันได้มีการนำโพรไบโอติกมาปรับใช้ในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะ ทั้งนี้โพรไบโอติกมีประโยชน์ต่อร่างกายของสัตว์จึงเหมาะเป็นทางเลือกสำหรับเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ (Abdelqader et al., 2013)

1.2.12. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Gu และคณะ (2015) ศึกษาศักยภาพโพรไบโอติกของ *Bacillus coagulans* ที่คัดแยกจากมูลลูกสุกรที่มีสุขภาพดี ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่ามีคุณสมบัติสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ เช่น *E. coli, Staphylococcus aureus, Salmonella enterica, Staphylococcus suis* และ *Listeria monocytogenes* ทดสอบความทนต่อสภาวะที่เป็นกรดและเกลือน้ำดี อัตรารอดตายของ *B. coagulans* ลดลงเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 4 ชม. ภายใต้เกลือน้ำดี 0.9 เปอร์เซ็นต์ และสามารถทนต่อ pH 2 ได้นานถึง 2 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังสามารถผลิต

เอนไซม์อะไมเลส, โปรติเอส และเซลลูเลส การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน พบว่ามีความปลอดภัยในการใช้กับหนูทดลอง ผลการทดลองนี้จึงแสดงให้เห็นว่า *B. coagulans* สายพันธุ์ใหม่ที่คัดแยกได้จากมูลลูกสุกรที่มีสุขภาพดี มีแนวโน้มที่จะเป็นโพรไบโอติกที่มีศักยภาพที่ดี

Sobczak และ Kozłowski (2015) ศึกษาผลของการใช้ *B. subtilis* เป็นสารเสริมในอาหารไก่ไข่ โดยใช้ไก่ไข่สายพันธุ์ Lohmann Brown อายุ 26 สัปดาห์ กลุ่มควบคุมจะได้รับอาหารสูตรพื้นฐาน และกลุ่มทดลองจะได้รับอาหารที่เสริมด้วยโพรไบโอติก *B. subtilis* ในปริมาณ 1×10^8 CFU/กิโลกรัม พบว่าไก่ที่ได้รับอาหารที่เสริมด้วยโพรไบโอติกจะมีน้ำหนักตัว อัตราการวางไข่ ปริมาณอาหารที่กินและคุณภาพไข่ไม่ว่าจะเป็น คุณภาพของไข่ขาว ความหนาของเปลือก น้ำหนักของไข่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เสริมโพรไบโอติก และผลต่อปริมาณคอเลสเตอรอลของไขมันในไข่ซึ่งกลุ่มที่เสริมโพรไบโอติกจะมีปริมาณไขมันในไข่แดงลดลง จากผลการทดลองสรุปได้ว่า *B. subtilis* มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกช่วยปรับปรุงคุณภาพของไข่ไก่ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยอาหารและการดูดซึมสารอาหาร และลดปริมาณคอเลสเตอรอลของไขมันในไข่แดงได้

Yaneisy และคณะ (2016) ศึกษาการใช้แบคทีเรียกรดแล็กติก เพื่อเป็นสารเสริมโพรไบโอติกในสัตว์ โดยคัดแยกเชื้อมาจากมูลของไก่เนื้อสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกได้ คือ *Lactobacillus crispatus, Lactobacillus pentosus*, *Weissella cibaria*, *Pediococcus pentosaceus* และ *Enterococcus hirae* ทดสอบคุณสมบัติการผลิตกรดแล็กติก การทนต่อกรดและเกลือน้ำดี การยับยั้งเชื้อก่อโรค และความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่า *L. pentosus* มีคุณสมบัติที่ดี สามารถผลิตกรดแล็กติกได้สูง มีความทนต่อค่า pH ต่ำ และความเข้มข้นของเกลือน้ำดีสูง สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Salmonella enterica, Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* และ *Shigella flexneri* และมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ และเสริมให้กับไก่เนื้อโดยผสมอาหารในปริมาณ 10^6 และ 10^8 CFU/g พบว่ามีผลทำให้น้ำหนักตัวของไก่เนื้อเพิ่มขึ้น และเพิ่มอัตราผลผลิตในแต่ละส่วนของซาก ได้แก่ ส่วนของหน้าอก เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. หลายชนิดสามารถสร้างสารสีหรือรงควัตถุ และมีคุณสมบัติในการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร และมีความปลอดภัย สามารถนำไปใช้เป็นสีผสมอาหาร หรือสารเสริมในอาหารสัตว์ได้ และบางชนิดสามารถสร้างสารสีที่มีคุณสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญ หรือเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น มีคุณสมบัติเป็นวิตามิน ตัวอย่างแบคทีเรียที่เป็นแหล่งสารสี เช่น *B. subtilis* ซึ่งได้มีการนำมาใช้เสริมในการเลี้ยงสัตว์ไม่ว่าจะเป็นการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สัตว์บก หรือสัตว์เศรษฐกิจอื่น ๆ จากงานวิจัยของ Hossain และคณะ (2016) ศึกษาผลของการเสริม *B. subtilis*, *Clostridium butyricum* และ *Lactobacillus acidophilus* โดยเสริมเป็นสปอร์โพรไบโอติกรวมในอาหารให้ไก่เนื้อ โดยใช้ไก่กระทง โดยทดลองเป็นเวลา 35 วัน

พบว่าในกลุ่มที่เสริมสปอร์โพรไบโอติกรวมในอาหารมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น อัตราการแลกเนื้อ (FCR) ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้อาหารปกติ และตรวจสอบ *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* ในสำไส้ใหญ่และลำไส้เล็กส่วนต้น พบว่ามีจำนวนเพิ่มมากขึ้น และจำนวนของ *Clostridium perfringens* ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้อาหารปกติที่ไม่เสริมโพรไบโอติก

Bami และคณะ (2017) ศึกษาผลของการเสริม *B.coagulans* ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกและอนุภาคนาโนของสังกะสีออกไซด์ ต่อการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันในไก่เนื้อ โดยผสมโพรไบโอติกในอาหารปริมาณ 10^{10} CFU/กิโลกรัม และอนุภาคนาโนของสังกะสีออกไซด์ 25 และ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหาร ทดลองทั้งหมด 42 วัน พบว่า การเสริมโพรไบโอติกมีผลต่อการเพิ่มน้ำหนักตัว (BWG) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) และกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน และการเสริมอนุภาคนาโนของสังกะสีออกไซด์สามารถเพิ่มความยาวของ villi ในลำไส้ได้อีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เสริมโพรไบโอติกและอนุภาคนาโนของสังกะสีออกไซด์

Gobi และคณะ (2018) ศึกษาผลการเสริม *B. licheniformis* ในอาหารต่อการเจริญเติบโตของปลานิล โดยเสริมในปริมาณ 10^5 และ 10^7 CFU/กรัม ทดลองในปลานิลเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า การเจริญเติบโตในแง่ของน้ำหนักสุดท้าย (FW), อัตราการเจริญเติบโตเฉพาะ (SGR), อัตราการเปลี่ยนอาหาร (FCR), พารามิเตอร์ภูมิคุ้มกันของโปรตีนทั้งหมด (TP), ค่าการต้านอนุมูลอิสระของ superoxide dismutase (SOD) และ glutathione peroxidase (GPx) ในซีรั่มและเมือกของปลาที่เลี้ยงด้วยกาเสริมโพรไบโอติกมีค่าเพิ่มขึ้น อัตราการตายน้อยลง ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และยับยั้งเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในปลานิลได้

Upadhaya และคณะ (2019) ศึกษาประสิทธิภาพของการเสริม *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ในอาหาร ต่อระยะเวลาในการผลิตไข่ จุลินทรีย์ในมูลและคุณภาพไข่ของไก่ไข่ไฮไลน์บราวน์ โดยทดลองเป็นเวลา 45 สัปดาห์ โดยเสริมในปริมาณ $8x10^5$ CFU/กรัม พบว่าไก่กลุ่มที่เสริม *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ในอาหาร มีอัตราการกินอาหารเพิ่มขึ้น อัตราการผลิตไข่เพิ่มขึ้นและระยะเวลาในการผลิตไข่สั้นลง ลดปริมาณของ *E. coli* ในมูลได้ แต่ไม่มีผลต่อปริมาณของแบคทีเรียกรดแล็กติก, *C. perfringens* และ *Salmonella* และในสัปดาห์ที่ 25 จะช่วยเพิ่มสีไข่แดงให้เข้มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

สิรสา (2556) ศึกษาการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยวิธีการห่อหุ้มร่วมกับเส้นใยจากพืชหัว โพรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยแคลเซียมแอลจิเนต ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus plantarum* CIF7A5, *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 และ *L.acidophilus* TISTR 1034 ที่แยกมาจากคน หนูและอาหารหมัก ตามลำดับ นำไปทดสอบการทนต่อสภาวะที่เป็นกรด pH 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าการห่อหุ้ม *L. plantarum* CIF17 A5 มีการรอดชีวิตสูงสุด คือ 83.57 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ *L. plantarum* TISTR 875 และ *L. acidophilus* TISTR 1034 มีอัตรการ

รอดชีวิต 74.79 และ 65.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของโพรไบโอติกจากสภาวะที่มีกรดสูงได้มากกว่าเซลล์อิสระ การศึกษาการทนต่อกรดของ *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ห่อหุ้มด้วยแอลจิเนต ร่วมกับการเติมสารสกัดและเส้นใยอาหารจากพืชหัว 3 ชนิด พบว่า *L. plantarum* CIF17 A5 ที่ถูกห่อ หุ้มร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูท 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร มีการรอดชีวิตสูงสุดคือ 86.12 เปอร์เซ็นต์ จากสภาวะที่เป็นกรด pH 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ขณะที่เซลล์อิสระที่ไม่ถูกห่อหุ้มและเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มแต่ไม่เติมเส้นใยจากพืช ให้อัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 37.21 แล ะ 81.81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยการใช้เส้นใยบีทรูทความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของ *L. plantarum* CIF17 A5 จาก 37.75 เป็น 86.78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเซลล์ที่ห่อหุ้มเซลล์ร่วมกับการเติมเส้นใยจากหัวบีทรูทมาผ่านสภาวะเป็นกรด pH 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และเกลือน้ำดีเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่ว โมง แบบต่อเนื่อง พบว่ามีการรอดชีวิตเท่ากับ 7.98 log CFU ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งเป็นเซลล์อิสระ และเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มโดยไม่เติม เส้นใยจากพืชหัวให้การรอดชีวิตเท่ากับ 3.30 และ 6.45 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การห่อหุ้ม *L. plantarum* CIF17 A5 ด้วย โซเดียมแอลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับเส้นใยจากหัวบีทรูทให้อัตราการรอดชีวิตสูงกว่าเซลล์อิสระ เมื่อเก็บรักษาในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือแกง 8 เปอร์เซ็นต์ หรือน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ อาหารเหลว skim milk เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ หรือแม้แต่ในอาหารเหลว MRS (pH 4.5) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

1.3. วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียบาซิลลัสที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน

2. เพื่อจำแนกแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วยวิธีทางชีวเคมี ทดสอบคุณสมบัติความเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก และจำแนกสายพันธุ์ด้วยวิธีทางจุลชีววิทยาระดับโมเลกุล 16S rDNA

3. เพื่อศึกษาผลของการเสริมแบคทีเรียบาซิลลัส ต่อสมรรถภาพการผลิต และคุณภาพของไข่ไก่

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

2.1. วิธีการดำเนินการ

2.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

2.1.1.1 ลำไส้ครัสเตเซียน จากงานวิจัยของ ปิยวรรณ (2560) และทศพร (2558) ตัวอย่างได้แก่ ปูดำ (*Scylla serrata*) ปูม้า (*Portunus pelagicus*) และกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*) จากบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยและอันดามัน โดยได้จากการจับของชาวประมงพื้นบ้านในจังหวัดนครศรีธรรมราช จังหวัดสุราษฎร์ธานี จังหวัดกระบี่ และจังหวัดตรัง

2.1.1.2 ดินจากบ่อเลี้ยงกุ้ง ในฟาร์มกุ้ง อำเภอพุนพิน สุราษฎร์ธานี ตัวอย่างจากงานวิจัยของชนิกานต์และณิชารีย์ (2560) ดินที่นำมาคัดแยกจะมีค่าความเป็นกรดเบสที่ประมาณ 8 ดินมีลักษณะเป็นตะกอนที่เกิดจากการทับถมของเศษอาหารและของเสียที่ถูกขับถ่ายออกมาจากกุ้ง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างบริเวณขอบบ่อ และกลางบ่อ ที่ระดับความลึก 5-10 เซนติเมตร

2.1.1.3 ดินจากบ่อน้ำพุร้อน ตำบลท่าสะท้อน อำเภอพุนพิน สุราษฎร์ธานี ซึ่งเป็นบ่อน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส มีค่าความเป็นกรดเบสประมาณ 7.9 ปริมาณมวลสารทั้งหมดและแร่ธาตุอื่น ๆ ประมาณ 1,980 ppm โดยสุ่มเก็บตัวอย่างที่ระดับความลึก 5-10 เซนติเมตร

2.1.1.4 มูลไก่ จากฟาร์มไก่ไข่ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี จากแม่ไก่สายพันธุ์ไฮไลน์บราวน์ ที่เลี้ยงแบบไม่มีการฉีดฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต หรือกินอาหารที่มีสารพิษตกค้าง และไม่มีการใช้ยาปฏิชีวะและสารเคมีในการเลี้ยง

2.1.2 การคัดแยกแบคทีเรีย และการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด

นำตัวอย่างจากข้อ 2.1.1.3 และ 2.1.1.4 มาชั่ง 5 กรัม แล้วเจือจางด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) 45 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายมาเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1}–10^{-6} และนำสารละลายตัวอย่างที่ความเข้มข้น 10^{-4}–10^{-6} มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเกลี่ยลงบนอาหาร Nutrient Agar (NA) แต่ละความเข้มข้นทดลอง 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละตัวอย่าง (Ngo et al., 2016)

2.1.3 การคัดแยกแบคทีเรีย และการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีให้ความร้อน

นำสารละลายตัวอย่างที่มีการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1}–10^{-6} นำมาให้ร้อนความที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา10 นาที และนำลงไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้องทันที จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย

เกลี่ยลงบนอาหาร NA แต่ละความเข้มข้นทดลอง 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่าง (Boottanun et al., 2017)

2.1.4 การเลี้ยงแบคทีเรียให้บริสุทธิ์และการเก็บสต๊อกแบคทีเรียที่คัดแยกได้

แยกโคโลนีที่มีลักษณะคล้าย *Bacillus* sp. มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเขี่ยลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จนได้เป็นโคโลนีเดี่ยว นำแบคทีเรียที่ได้มาเก็บสต๊อกโดยแยกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเก็บแบคทีเรียในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2.1.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี

2.1.5.1 การทดสอบการย้อมแกรม

นำแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Bacillus* sp. จากข้อ 2.1.4 มาทดสอบการย้อมแกรม เพื่อดูการติดสี แกรม และรูปร่าง โดยการนำห่วงถ่ายเชื้อไปแตะโคโลนีแบคทีเรีย แล้วนำมาผสมกับหยดน้ำบนกระจกสไลด์ที่สะอาด จากนั้นเกลี่ยให้กระจายออกเป็นบริเวณบาง ๆ ทิ้งไว้ในอากาศให้แห้ง แล้วนำกระจกสไลด์ไปผ่านเปลวไฟอ่อน ๆ ประมาณ 3-4 ครั้ง หยดสี Crystal violet ลงบนกระจกสไลด์ นาน 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น หยด Gram iodine ลงบนกระจกสไลด์ นาน 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น ล้างกระจกสไลด์ด้วย Acetone-alcohol นาน 15 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยดสี Safranin นาน 30 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น ซับด้วยกระดาษทิชชูให้แห้ง นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ด้วยกำลังขยาย 1000 เท่า ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. จะติดสีแกรมบวก (สีม่วงหรือสีน้ำเงิน) รูปร่างเป็นแท่ง และสร้างสปอร์

2.1.5.2 การทดสอบทางชีวเคมี

นำแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Bacillus* sp. จากข้อ 11.5.1 มาทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ การทดสอบ Motility แคทาเลส ไฮโดรลิซิสของแป้ง อินโดล และ ออกซิเดส โดยอ้างอิงผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ตามรายงานของ Navinchandran และคณะ (2014) ซึ่งมีวิธีการทดสอบทางชีวเคมี ดังนี้

2.1.5.2.1 การทดสอบแคทาเลส นำห่วงถ่ายเชื้อไปแตะโคโลนีแบคทีเรีย แล้วนำมาแตะลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาด จากนั้นหยดไฮโดรเจนเperอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ที่มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนเชื้อที่อยู่บนกระจกสไลด์ สังเกตการณ์เกิดฟองแก๊ส แบคทีเรีย *Bacillus* sp. สามารถย่อยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ได้ ซึ่งดูได้ จากฟองแก๊สที่เกิดขึ้นในทันทีหลังจากการหยดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (ศุภยางค์, 2547)

2.1.5.2.2 การทดสอบออกซิเดส หยด Kovac's oxidase reagent ลงบนแผ่นกระดาษกรอง นำห่วงถ่ายเชื้อไปแตะโคโลนีแบคทีเรีย แล้วนำมาขีดลงบนแผ่นกระดาษกรอง สังเกตการเปลี่ยนสีภายในเวลา 10-15 โดยแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. จะไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไซโทโครมออกซิเดสได้ ซึ่งจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีม่วงหรือ สีน้ำเงินเข้มบนแผ่นกระดาษกรอง (ศุภยางค์, 2547)

2.1.5.2.3 การทดสอบ Motility นำเข็มเขี่ยเชื้อไปแตะโคโลนีแบคทีเรีย แล้วนำมา stab ตรง ๆ ลงในอาหาร Motility test medium ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดย stab ความสูงประมาณ 2 ใน 3 ของส่วนสูงอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ได้ จะเห็นการเจริญออกมานอกรอย stab หรือจะไม่มีรอยการเจริญที่ชัดเจนบริเวณนอกรอย stab แต่อาหารทั้งหลอดจะขุ่นกว่าเดิม (ศุภยางค์, 2547)

2.1.5.2.4 การทดสอบอินโดล นำห่วงถ่ายเชื้อไปแตะโคโลนีแบคทีเรีย นำมาถ่ายลงในอาหารเหลว Tryptone ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นหยดด้วย Kovac's reagent ลงในอาหาร ประมาณ 5 หยด เขย่าเบา ๆ สังเกตสีที่เกิดขึ้น แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ไม่สามารถผลิตอินโดลได้ ซึ่งจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นสีแดงบนผิวหน้าของอาหาร (ศุภยางค์, 2547)

2.1.5.2.5 การทดสอบไฮโดรลิซิสของแป้ง นำเข็มเขี่ยเชื้อไปแตะโคโลนีแบคทีเรีย แล้วนำมาจุดลงบนอาหารแข็ง Starch บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นหยดด้วยสารละลายไอโอดีนจนทั่วผิวหน้าอาหาร สังเกตสีของอาหาร แบคทีเรีย *Bacillus* sp. จะสามารถย่อยแป้งได้ ซึ่งอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินหลังจาก หยดด้วยสารละลายไอโอดีนแต่บริเวณรอบการเจริญของแบคทีเรียจะเกิดโซนใสไม่มีสี (ศุภยางค์, 2547)

2.1.6 การทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย

เลือกแบคทีเรียที่มีผลการทดสอบทางชีวเคมีคล้ายกับแบคทีเรีย *Bacillus* sp. จากข้อ 2.1.5 ขีดลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำมาเลี้ยงต่อในอาหาร Luria Bertani (LB) broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มแบบเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงบนอาหาร Difco Sporulation Medium (DSM) ให้ทั่วบริเวณผิวหน้าอาหารแล้วจึงดูดส่วนเกินของเชื้อออกจากจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง ขูดสปอร์ออกจากผิวหน้าอาหารและล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ การทดสอบหาประสิทธิภาพการสร้างสปอร์โดยแบ่งเป็นสองกลุ่มทดลอง คือ กลุ่มที่ทดสอบด้วยความร้อน นำสปอร์แบคทีเรียไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และกลุ่มที่ไม่ให้ความร้อน จากนั้นเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1}–10^{-5} และนำความเข้มข้น 10^{-4}–10^{-5} มาเกลี่ยลงบนอาหาร NA แต่ละความเข้มข้นจะทดลอง 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แต่

ละไอโซเลต ทดลอง 3 ซ้ำตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในแต่ละกลุ่มเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ ตรวจสอบการสร้างสปอร์โดยการนำห่วงถ่ายเชื้อแตะโคโลนีที่เจริญบนอาหารมาเกลี่ยบนกระจกสไลด์ที่มีน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหยดอยู่ เกลี่ยให้เข้ากัน ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า เพื่อดูการสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย (Ghelardi et al., 2013)

$$\text{ประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ (\%)} = \frac{\text{จำนวนสปอร์ทั้งหมดที่นับได้เมื่อให้ความร้อน (log CFU/ml)}}{\text{จำนวนสปอร์ทั้งหมดที่นับได้ก่อนให้ความร้อน (log CFU/ml)}} \times 100$$

2.1.7 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ

เลือกแบคทีเรียที่มีผลประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ดีที่สุดจากข้อ 2.1.6 มาเลี้ยงในอาหาร LB จนได้ระยะ mid-log phase (10^7-10^8 CFU/ml) แล้วนำมาป้าย (Swab) ลงบนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) นำแผ่นดิสก์ยาปฏิชีวนะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ของยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (10 µg/disc), เททราไซคลิน (30 µg/disc), กานามัยซิน (30 µg/disc), คลอแรมเฟนิ-คอล (30 µg/disc), อะมอกซีซิลลิน (30 µg/disc) และคลอกซาซิลลิน (1 µg/disc) จากนั้นนำมาวางลงบนจานเพาะเชื้อที่ได้มีการป้ายเชื้อไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณวงใสของการยับยั้ง (Gu et al., 2015)

2.1.8 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

เลือกแบคทีเรียที่มีผลประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ดีที่สุดจากข้อ 2.1.6 มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

2.1.8.1 การเตรียมส่วนใสปราศจากเซลล์ (Cell free supernatant)

นำห่วงถ่ายเชื้อไปแตะเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร NA แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 3 วัน ถ่ายเชื้อในอาหาร LB ลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสมากรองด้วยเข็มฉีดยาตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน แล้วนำส่วนใสปราศจากเซลล์ (Cell free supernatant) ของเชื้อแบคทีเรียไปทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ (Gu et al., 2015)

2.1.8.2 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

นำห่วงถ่ายเชื้อไปแตะเชื้อแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *E. coli* ATCC 25922 บนอาหาร NA ถ่ายเชื้อลงในอาหาร NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที จนได้เชื้อในระยะ Mid-log phase ซึ่งมีความหนาแน่นของ

เชื้อเป็น 10^8 Colony Forming Unit ต่อมิลลิลิตร จากนั้นถ่ายเชื้อมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร MHA ให้ทั่ว เจาะหลุมด้วยที่เจาะจุกคอร์ก มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 มิลลิเมตร ทำเช่นเดียวกัน ในการเลี้ยงแบคทีเรีย สำหรับ *V. parahaemolyticus* มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร NA และอาหาร NB (Liu et al., 2014)

2.1.8.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion

หยดส่วนใสปราศจากเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมที่เกลี่ยเชื้อแบคทีเรียทดสอบบนผิวหน้าอาหาร MHA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทดลองเป็นจำนวน 3 ซ้ำ แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณโซนใส (Clear zone) ในหน่วยมิลลิเมตร (mm) ซึ่งเป็นบริเวณที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ โดยใช้ยาปฏิชีวนะไซโปรฟลอกซาซิน (CF) ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นตัวควบคุมบวก และอาหาร LB เป็นตัวควบคุมลบ (Liu et al., 2014)

2.1.9 การทดสอบการทนความร้อน และแอลกอฮอล์ของแบคทีเรีย

นำสปอร์แบคทีเรียที่มีผลประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ดีที่สุดจากข้อ 2.1.6 ที่เป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. มาทดสอบการทนต่อความร้อนและแอลกอฮอล์ของสปอร์โดยแบ่งเป็นสามกลุ่มทดลอง คือ ให้ความร้อน 95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (Minh et al., 2011) กลุ่มที่เติมแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ผสมกับสปอร์ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที และกลุ่มควบคุมที่ไม่เติมแอลกอฮอล์ จากนั้นเจือจางเชื้อทั้งสามการทดสอบที่ความเข้มข้น 10^{-1}–10^{-6} และนำสปอร์ที่เจือจางมาเกลี่ยบนอาหาร NA โดยในแต่ละความเข้มข้นจะทดลอง 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีสปอร์ที่เกิดขึ้นในแต่ละกลุ่มเพื่อเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีในกลุ่มที่ให้ความร้อน ที่แช่ในแอลกอฮอล์ และกลุ่มควบคุมที่ไม่ให้ความร้อนและไม่เติมแอลกอฮอล์ (Nerandzic et al., 2015) คำนวณอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการรอดชีวิต (\%)} = \frac{\text{จำนวนสปอร์แบคทีเรียทั้งหมดที่นับได้หลังการทดสอบ (log CFU/ml)}}{\text{จำนวนสปอร์แบคทีเรียทั้งหมดที่นับได้ของชุดควบคุม (log CFU/ml)}} \times 100$$

2.1.10 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดของแบคทีเรีย

เลือกแบคทีเรียที่มีผลประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ดีที่สุดจากข้อ 2.1.6 ที่เป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. จากสต๊อกที่ได้เก็บไว้เขี่ยลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเข็มเขี่ยเชื้อแตะบนโคโลนีของแบคทีเรีย แล้วนำมาขีดลงบนอาหารแข็ง Sheep blood บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และสังเกตความสามารถการย่อยเม็ดเลือด

แดงของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียต้องไม่มีความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง ซึ่งจะไม่เกิดเป็นโซนใสบริเวณรอบ ๆ การเจริญของโคโลนี โดยใช้ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *V. parahaemolyticus* เป็น positive control ในการเปรียบเทียบ อ่านผลโดยสังเกตโซนใสจากการย่อยเม็ดเลือดของแบคทีเรีย (Manhar et al., 2016)

2.1.11 การทดสอบการทนกรดในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดีของแบคทีเรีย

นำสปอร์แบคทีเรียที่มีผลประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ดีที่สุดจากข้อ 2.1.6 ที่เป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. มาทดสอบการทนกรดในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดีของสปอร์ โดยถ่ายสปอร์เชื้อลงในเพปซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ปรับค่า pH เป็น 2.0, 2.5 และ 3.0 โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก และสารละลายเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบแบคทีเรียที่รอดชีวิต โดยเจือจางลง 10 เท่า ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ และนำมาเกลี่ยลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Manhar et al., 2015 และ Ritter et al., 2018) คำนวณอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโดยใช้สูตรตามข้อ 2.1.9

2.1.12 การเตรียมสปอร์และทดสอบคุณสมบัติของสปอร์เพื่อใช้เป็นสารเสริมโพรไบโอติก

2.1.12.1 การเตรียมสปอร์

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติก มาเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร DSM ให้ทั่วบริเวณผิวหน้าอาหารแล้วจึงดูดส่วนเกินของเชื้อออกจากจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นใช้แผ่นสไลด์ที่ฆ่าเชื้อขูดสปอร์บนผิวหน้าอาหารลงในหลอดเซนทริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่แช่เย็น และนำสปอร์ที่ได้มาให้ความร้อน 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาทีเพื่อฆ่าเซลล์แบคทีเรีย (Yaneisy et al., 2016)

2.1.12.2 การผสมสปอร์แบคทีเรียในอาหารไก่ไข่ และการตรวจสอบความมีชีวิตของสปอร์

นำสปอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.1.12.1 มาผสมในอาหารไก่ ทำให้แห้งโดยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และตรวจสอบความมีชีวิตของสปอร์โดยนำอาหารมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน ทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำอาหารไก่ 1 กรัม มาเจือจางด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ เกลี่ยลงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (กาญจนา, 2556)

2.1.13 การห่อหุ้มสปอร์แบคทีเรียด้วยโซเดียมแอลจิเนต

นำสปอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.1.12.1 มาตรึงเซลล์สปอร์ด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) นำสารละลายสปอร์แบคทีเรีย ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมด้วยโซเดียมแอลจิเนตปริมาตร 18 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) คนสารละลายต่อเนื่องให้เข้ากันเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แบ่งสารละลายเพื่อหาปริมาณแบคทีเรียด้วยการทำ Total plate count นำสารละลายส่วนที่เหลือบรรจุลงหลอดฉีดยา และหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ คนให้เม็ดเจลขึ้นรูปนาน 30 นาที แยกเม็ดแอลจิเนตออกจากสารละลาย ล้างเม็ดเจลด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเก็บในสารละลายเพปโตน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (pH 6) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนนำไปใช้งาน (Phoem et al., 2015)

2.1.14 การวัดประสิทธิภาพการห่อหุ้ม การปลดปล่อยเซลล์ ขนาด และทดสอบคุณสมบัติการรอดชีวิตของสปอร์ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนต

2.1.14.1 การวัดประสิทธิภาพการปลดปล่อยเซลล์ออกจากเม็ดแอลจิเนต

นำไมโครแอลจิเนต 1 กรัม จากข้อ 2.1.13 มาแช่ในฟอตเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) 9 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเซลล์สปอร์โดยเจือจาง 10 เท่า ในโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำสารละลายสปอร์มาเกลี่ยเลี้ยงบนอาหาร NA โดยในแต่ละความเข้มข้นจะทำ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีและคำนวณประสิทธิภาพในการปลดปล่อยเซลล์ออกจากเม็ดแอลจิเนต (Phoem et al., 2015)

$$\text{Cell release (\%)} = \frac{N}{N_0} \times 100$$

(%) Cell release = ประสิทธิภาพในการปลดปล่อยเซลล์ที่ถูกห่อหุ้ม

N_0 = จำนวนของสปอร์แบคทีเรียเริ่มต้น (log CFU/ml)

N = จำนวนของสปอร์แบคทีเรียที่ถูกปลดปล่อยจากเม็ดแอลจิเนต (log CFU/g)

2.1.14.2 การวัดประสิทธิภาพการห่อหุ้มสปอร์

นำเม็ดแอลจิเนต 1 กรัม จากข้อ 2.1.13 มาแช่ในฟอตเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) 9 มิลลิลิตร ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ม 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำส่วนใสมาตรวจนับจำนวนเซลล์โดยเจือจาง 10 เท่า ในโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ และเกลี่ยบนอาหาร NA โดยในแต่ละความเข้มข้นทำ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีและคำนวณประสิทธิภาพในการห่อหุ้มเซลล์ (Phoem et al., 2015)

$$\text{Encapsulation yield (\%)} = \frac{N}{N_o} \times 100$$

(%) Encapsulation yield = ประสิทธิภาพในการห่อหุ้มสปอร์

N_0 = จำนวนของสปอร์แบคทีเรียเริ่มต้นทั้งหมดที่นำมาห่อหุ้ม (log CFU/ml)

N = จำนวนของสปอร์แบคทีเรียที่ถูกห่อหุ้มจากเม็ดแอลจิเนต (log CFU/g)

2.1.14.3 การทดสอบคุณสมบัติการรอดชีวิตของสปอร์ที่ตรึงด้วยโซเดียมแอลจิเนตต่อกรดในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดี

นำเม็ดแอลจิเนตจากข้อ 2.1.13 จำนวน 1 กรัม มาแช่ในโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่ผสมกับเพปซิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ปรับค่า pH เป็น 2.0, 2.5 และ 3.0 และสารละลายเกลือน้ำดี 0.1, 0.3 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนสปอร์ก่อนและหลังการทดสอบเหมือนข้อที่ 2.1.14.1 และคำนวณอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียโดยใช้สูตรตามข้อ 2.1.9

2.1.14.4 การทดสอบคุณสมบัติการรอดชีวิตของสปอร์ที่ตรึงด้วยโซเดียมแอลจิเนตในอาหารไก่ไข่

นำเม็ดแอลจิเนตจากข้อ 2.1.13 มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส (He et al., 2015) เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง และนำมาผสมในอาหารไก่ในอัตราส่วนของเม็ดแอลจิเนต 1 กรัมต่ออาหารไก่ 100 กรัม ตรวจสอบความมีชีวิตของสปอร์โดยนำอาหารมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน ทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นนำอาหารไก่ 1 กรัม มาเจือจางด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ เกลี่ยลงในเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง (กาญจนา, 2556 และ Nguyen et al., 2015) และนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และคำนวณอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย โดยใช้สูตรตามข้อ 2.1.9

2.1.15 การจำแนกระดับสปีชีส์โดยการตรวจสอบยีน

2.1.15.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เลือกแบคทีเรียที่มีผลการทดสอบว่ามีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดีที่สุดเพียงไอโซเลตเดียว เลี้ยงในอาหาร NB ดูดใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ แล้วนำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ เทส่วนใสทิ้งแล้วเติม Bacillus lysis buffer pH 7.5 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นนำ beat ball ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ แล้ว ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ ประมาณ 5-10 เม็ด จากนั้นทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องบดตัวอย่างอัตโนมัติที่ความเร็ว 20 รอบต่อวินาที นาน 2 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสมาเติมสารละลาย Phenol : Chloroform : Isoamyl (25:24:1) 300 ไมโครลิตร แล้วพลิกหลอดกลับไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที

นาน 5 นาทีดูดส่วนใสด้านบนมาประมาณ 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนทริฟิวจ์หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติมโซเดียมอะซีเทต 3M ปริมาตร 20 ไมโครลิตร พลิกหลอด 10 ครั้งเติม Absolute เอทานอลที่เย็น 150 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 °C นาน 10 นาที เมื่อครบเวลานำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วเท Absolute เอทานอลทิ้งล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นใช้ปิเปตดูดเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งแล้วทำให้แห้ง ละลายตะกอน DNA ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 20 ไมโครลิตร เพื่อรอไปวิเคราะห์ปริมาณและตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ (Kovacs et al., 2010)

2.1.15.2 การวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.1.15.1 มาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และวิเคราะห์ปริมาณด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอ เนื่องจากกรดนิวคลีอิกสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ส่วนโปรตีนจะดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จึงสามารถหาปริมาณดีเอ็นเอได้ และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ซึ่งอัตราส่วนของดีเอ็นเอควรมีค่าไม่ต่ำกว่า 1.8 - 1.9 ซึ่งถ้าต่ำกว่านี้แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนสูง ซึ่งอาจจะต้องนำดีเอ็นเอนี้ไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้ง และวิเคราะห์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟริซิสโดยใช้อะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ 0.5x TBE buffer 100 มิลลิลิตร นำมาหลอมให้ละลายแล้วเทลงใน gel apparatus เมื่อเจลแข็งตัวจึงนำมาใส่ chamber จากนั้นเท 0.5x TBE buffer ให้ท่วม นำดีเอ็นเอของแบคทีเรียปริมาณ 5 ไมโครลิตร มาผสมกับ loading dye 3 ไมโครลิตร แล้ว load ลงในช่องเจล ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตรวจดูเจลโดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1000 คู่เบส (สุรินทร์, 2552)

2.1.15.3 การเพิ่มปริมาณยีนด้วยปฏิกิริยา PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.1.15.1 ทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ยีน *gyrA* ตามรายงานของ Nguyen และคณะ (2015) โดยมีลำดับเบส Forward primer gyrA-F:5'-CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT-3' และ Reverse primer gyrA-R: 5'-CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT-3' เตรียม reaction mixture โดยเติมสาร ลงในหลอดพีซีอาร์ ดังนี้ dH_2O 10 ไมโครลิตร, 1X PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร, 0.25 mM dNTP mix 6.25 ไมโครลิตร, 2.5 mM $MgCl_2$ 2.5 ไมโครลิตร, 0.2 µM 27F Forward primer และ 1492R Reverse primer 0.25 ไมโครลิตร, แม่แบบ DNA, 0.5 U *Taq* polymerase 0.5 ไมโครลิตร นำหลอดพีซีอาร์ที่มีส่วนผสมของสารพีซีอาร์ ใส่ลงในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม แล้วตั้งโปรแกรมดังนี้ Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30

วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ

2.1.15.4 การวิเคราะห์ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 2.1.15.3 ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟริซิสโดยใช้อะกาโรสเจล 1.2 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ 0.5x TBE buffer 100 มิลลิลิตร นำมาหลอมให้ละลายแล้วเทลงใน gel apparatus เมื่อเจลแข็งตัวจึงนำมาใส่ chamber จากนั้นเท 0.5x TBE buffer ให้ท่วม นำดีเอ็นเอของแบคทีเรียปริมาณ 5 ไมโครลิตร จากการทำพีซีอาร์มาผสมกับ loading dye 3 ไมโครลิตร แล้ว load ลงในช่องเจล ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นตรวจดูเจล (สุรินทร์, 2552) จะได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 1000 คู่เบส จากนั้นนำแบคทีเรียส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (Biotech)

2.1.16 การทดสอบภาคสนามเพื่อตรวจสอบผลของการเสริม *Bacillus* sp. ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ต่อสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพของไข่ไก่

2.1.16.1 การศึกษาผลของการเสริม *Bacillus* sp. ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกในไก่ไข่

ทดลองโดยใช้ไก่ไข่สายพันธุ์ไฮไลน์บราวน์ อายุ 23 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม แต่ละกลุ่มใช้ไก่ 10 ตัว รวมไก่ที่ต้องใช้ทั้งหมด 50 ตัว โดยทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ทุกกลุ่มทดลองให้สปอร์โพรไบโอติกตามปริมาณที่กำหนด โดยกลุ่มทดลองประกอบด้วย

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ไก่ที่ไม่ได้รับสารเสริมโพรไบโอติก

กลุ่มที่ 2 ไก่ได้รับสารเสริมโพรไบโอติกสปอร์อิสระผสมกับอาหาร $1x10^6$ Spores

กลุ่มที่ 3 ไก่ได้รับสารเสริมโพรไบโอติกสปอร์อิสระผสมกับอาหาร $1x10^8$ Spores

กลุ่มที่ 4 ไก่ได้รับสารเสริมโพรไบโอติกสปอร์ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนต $1x10^6$ Spores

กลุ่มที่ 5 ไก่ได้รับสารเสริมโพรไบโอติกสปอร์ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนต $1x10^8$ Spores

2.1.16.2 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย *Salmonella* sp. จากมูลไก่

การนับจำนวนแบคทีเรีย *Salmonella* sp. โดยนำมูลไก่มา 5 กรัม มาเจือจางในโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำตัวอย่างที่มีค่าการเจือจางที่ 10^{-4}-10^{-6} ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหาร Salmonella Shigella agar และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่มีสีดำ ซึ่งเป็นโคโลนีของ *Salmonella* sp. (กาญจนา, 2556)

2.1.16.3 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย *E. coli* จากมูลไก่

การนับจำนวนแบคทีเรีย *E. coli* โดยนำมูลไก่มา 5 กรัม มาเจือจางในโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำตัวอย่างที่มีค่าการเจือจางที่ 10^{-4}-10^{-6} ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหาร Eosin Methylene Blue agar และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่มีการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (กาญจนา, 2556)

2.1.16.4 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติกจากมูลไก่

การนับจำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติก โดยนำมูลไก่มา 5 กรัม มาเจือจางในโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำตัวอย่างที่มีค่าการเจือจางที่ 10^{-4}-10^{-6} ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยลงบนอาหาร De Man Rogosa and Sharpe (MRS) agar ที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต 1 เปอร์เซ็นต์ และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่มีโซนใสเกิดขึ้น (กาญจนา, 2556)

2.1.16.5 การเก็บข้อมูลคุณภาพไข่ และสมรรถภาพการผลิตของไก่ไข่

คุณภาพไข่ ได้แก่ น้ำหนักไข่ ความหนา ความแข็งแรงของเปลือก น้ำหนักเปลือก เปอร์เซ็นต์เปลือก น้ำหนักไข่แดง น้ำหนักไข่ขาว ความสดไข่ขาว และสีไข่แดง ส่วนสมรรถภาพการผลิต ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว เปอร์เซ็นต์การผลิตไข่ มวลไข่ ปริมาณอาหารที่กิน และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นผลผลิตไข่ โดยบันทึกข้อมูลทุกสัปดาห์ นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าต่าง ๆ ตามสูตร ดังนี้

$$\text{ปริมาณอาหารที่กิน (กรัม/วัน)} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กิน (กรัม)}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง}}$$

$$\text{การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว (กรัม)} = \text{น้ำหนักเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักเมื่อเริ่มทดลอง}$$

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นผลผลิตไข่} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กิน}}{\text{น้ำหนักไข่รวมทั้งหมด}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์ผลผลิตไข่} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่เก็บได้}}{\text{จำนวนไก่ทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{มวลไข่ (กรัม/ตัว/วัน)} = \text{น้ำหนักไข่เฉลี่ย} \times \text{เปอร์เซ็นต์ผลผลิตไข่เฉลี่ย}$$

2.1.16.6 การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำผลข้อมูลการทดสอบในห้องปฏิบัติการ หาค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้ T-Test และ ANOVA วิเคราะห์ค่านัยสำคัญของความแตกต่างข้อมูล และผลตรวจวัดคุณภาพไข่ทุกสัปดาห์ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์คุณภาพไข่ (Digital egg tester) และวัดสมรรถภาพการผลิตไข่ โดยนำผลที่ได้แต่ละกลุ่มการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่า $P \leq 0.05$ และพิจารณาว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS version 11

2.2. วัสดุอุปกรณ์การวิจัย

2.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient Agar (NA)
2. Nutrient Broth (NB)
3. Difco Sporulation Medium (DSM)
4. Luria Bertani (LB) broth
5. Salmonella Shigella (SS) agar
6. Eosin Methylene Blue (EMB) agar
7. De Man Rogosa and Sharpe (MRS) agar
8. Mueller Hinton Agar (MHA)

2.2.2 สารเคมี

1. เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (95% Ethanol)
2. โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (0.85% Sodium chloride)
3. กลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ (50% Glycerol)
4. น้ำกลั่น (Distilled water)
5. ชุดทดสอบ Biochemical test ได้แก่

   Motility test

   แคทาเลส test

   ออกซิเดส test

   อินโดล test

   ไฮโดรลิซิสของแป้ง

   Blood agar test

6. ชุดทดสอบการย้อมแกรมแบคทีเรีย ได้แก่

Crystal violet

Iodine Treatment

Decolorization

Counter stain safranin

7. ชุดสารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

8. ชุดสารเคมีสำหรับทำ PCR (PCR Master mix)

9. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)

10. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)

11. เอนไซม์เพปซิน (Pepsin)

12. สารละลายเกลือน้ำดี (Bile salt solution)

13. โซเดียมแอลจิเนต (Sodium alginate)

14. แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride)

15. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer)

2.2.3 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
2. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow)
3. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
4. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave)
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter)
6. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
7. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (High speed centrifuge)
8. เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer)
9. เครื่องวิเคราะห์คุณภาพไข่ (Digital egg tester)
10. ปิเปตอัตโนมัติ (Automatic pipette)
11. ตู้ -80 องศาเซลเซียส (Freezer -80^{o}C)
12. เครื่องชั่งน้ำหนัก (Analytical balance)
13. เครื่องเขย่าสารแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)

2.2.4 แบคทีเรีย

1. *Escherichia coli* ATCC 25922
2. *Bacillus subtilis* ATCC 6633
3. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
5. *Vibrio parahaemolyticus*

2.2.5 อุปกรณ์

1. เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
2. ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)
3. ไม้พันสาลี (Swab)
4. หลอดไมโครเซนตริฟิลล์ (Microcentrifuge tube)
5. หลอดเซนตริฟิลล์ (Centrifuge tube)
6. กระดาษกรอง (Filter Paper)
7. กระจกสไลด์ (Microscope slide)
8. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
9. หลอดทดลอง (Test tube)
10. กระบอกฉีดยา (Syring)
11. คีมคีบ (Forcep)
12. บีกเกอร์ (Beaker)
13. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)
14. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)
15. แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader)
16. แผ่นดิสก์ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic discs)
17. ที่วางหลอดทดลอง (Rack)

2.2.6 สัตว์ทดลอง

1. ไก่ไข่ สายพันธุ์ไฮไลน์บราวน์ (Hy-line brown laying hen)

2.2.7 อาหารไก่

1. ข้าวโพด (Corn)
2. กากถั่วเหลือง (Soybean meal)
3. รำละเอียด (Rice bran)
4. ปลาป่น (Fish meal)

5. เปลือกหอย (Oyster shell)
6. ไดแคลเซียมฟอสเฟต (Dicalcium Phosphate)
7. น้ำมันพืช (Plant oil)
8. เมทไธโอนีน (DL-Methionine)
9. เกลือ (Salt)
10. พรีมิกซ์ (Premix)

2.3 สถานที่ทำวิจัย

ห้องโครงงานและวิจัย 3 และฟาร์มเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี

บทที่ 3
ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลต

ในการศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสารสีจากตัวอย่างลำไส้ครัสเตเซียน ได้แก่ กุ้งแชบ๊วย ปูม้า และปูดำ จำนวน 4 ไอโซเลต จากการคัดแยกของทศพร (2558) และ ปิยวรรณ (2560) จากตัวอย่างดินบ่อกุ้งจำนวน 3 ไอโซเลต จากการคัดแยกของชนิกานต์และณิชารีย์ (2560) ได้แก่ ไอโซเลต SPMET10T1 SPMES06T1 CPPES01T2 CSSES08H2 CKNJh11 CKNJh19 และ CKNJh20 นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า CPPES01T2 CSSES08H2 CKNJh11 และ CKNJh19 มีคุณสมบัติคล้ายกับแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส คือ ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่ง และคัดแยกแบคทีเรียเพิ่มเติมจากตัวอย่างมูลไก่ และดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อน นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าจากตัวอย่างมูลไก่พบแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต คือ OYNH13 OYNH19 OYNH21 และ OYNH31 จากตัวอย่างดินบ่อน้ำพุร้อนพบแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต คือ SHPS1 SHPS2 SHPS4 HHPS5 และ THPS1 ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส คือ ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่งสั้นหรือแท่งยาว และบางไอโซเลตมีการสร้างสารสี โดยโคโลนีของแต่ล่ะไอโซเลตจะมีสีที่แตกต่างกัน ได้แก่ สีส้ม ชมพู เหลือง เหลืองครีม และขาวครีม ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลต

ตัวอย่าง	ไอโซเลต	สีโคโลนี	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	การติดสีแกรม	อ้างอิง
ลำไส้ครัสเตเซียน	CPPES01T2	ส้ม	แท่งสั้น	+	ทศพร (2558), ปิยวรรณ (2560)
	CSSES08H2	ชมพู	แท่งยาว	+	
ดินบ่อกุ้ง	CKNJh11	เหลือง	แท่งยาว	+	ชนิกานต์ และ ณิชารีย์ (2560)
	CKNJh19	ส้ม	แท่งสั้น	+	
มูลไก่	OYNH13	ขาวครีม	แท่งยาว	+	คัดแยกจากงานวิจัยนี้
	OYNH19	เหลืองครีม	แท่งสั้น	+	
	OYNH21	ขาวครีม	แท่งสั้น	+	
	OYNH31	ขาวครีม	แท่งสั้น	+	

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ + หมายถึง แบคทีเรียย้อมติดสีแกรมบวก

ตารางที่ 3 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลต

ตัวอย่าง	ไอโซเลต	สีโคโลนี	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	การย้อมติดสีแกรม	อ้างอิง
ดินบ่อน้ำพุร้อน	SHPS1	ขาวครีม	แท่งสั้น	+	คัดแยกจากงานวิจัยนี้
	SHPS2	ขาวครีม	แท่งสั้น	+	
	SHPS4	ขาวครีม	แท่งสั้น	+	
	HHPS5	ขาวครีม	แท่งสั้น	+	
	THPS1	ขาวครีม	แท่งยาว	+	

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ + หมายถึง แบคทีเรียย้อมติดสีแกรมบวก

3.2 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลต

จากการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลต ได้แก่ CPPES01T2 CSSES08H2 CKNJh11 CKNJh19 OYNH13 OYNH19 OYNH21 OYNH31 SHPS1 SHPS2 SHPS4 HHPS5 และ THPS1 ซึ่งได้จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ ย้อมติดสีแกรมบวก และมีรูปร่างเป็นแท่งสั้นหรือแท่งยาว นำมาทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่ แคทาเลส ออกซิเดส อินโดล Motility ไฮโดรลิซิสของแป้ง และ Spore formation เพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสในเบื้องต้น ผลการทดสอบคาดว่าแบคทีเรียทั้ง 13 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส โดยแบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถเคลื่อนที่ได้ ทดสอบการย่อยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์แคทาเลส และสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสมาใช้ในการย่อยแป้ง ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นบวก ทดสอบออกซิเดส พบว่าไม่มีการผลิตเอนไซม์ไซโทโครมออกซิเดส และการทดสอบอินโดล พบว่าไม่สามารถผลิตอินโดลจากทริพโตเฟนได้ ซึ่งให้ผลการทดสอบเป็นลบ และทั้ง 13 ไอโซเลต พบการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ ดังแสดงในตารางที่ 4

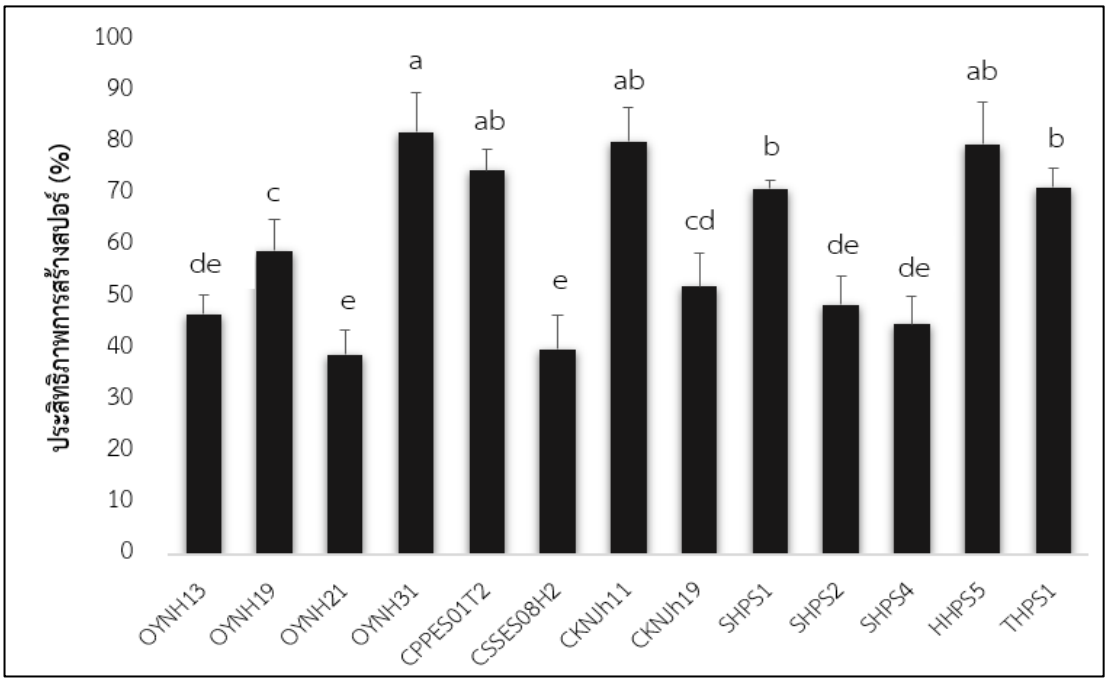
ตารางที่ 4 การทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลต

ไอโซเลต	การทดสอบทางชีวเคมี					
	แคทาเลส	ออกซิเดส	อินโดล	การเคลื่อนที่	การย่อยแป้ง	การสร้างสปอร์
OYNH13	+	-	-	+	+	+
OYNH19	+	-	-	+	+	+
OYNH21	+	-	-	+	+	+
OYNH31	+	-	-	+	+	+
CPPES01T2	+	-	-	+	+	+
CSSES08H2	+	-	-	+	+	+
CKNJh11	+	-	-	+	+	+
CKNJh19	+	-	-	+	+	+
SHPS1	+	-	-	+	+	+
SHPS2	+	-	-	+	+	+
SHPS4	+	-	-	+	+	+
HHPS5	+	-	-	+	+	+
THPS1	+	-	-	+	+	+

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ + หมายถึง ผลการทดสอบทางชีวเคมีเป็นบวก และสัญลักษณ์ – หมายถึง ผลการทดสอบทางชีวเคมีเป็นลบ ผลทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส คือ แคทาเลส Motility ไฮโดรลิซิสของแป้ง และการสร้างสปอร์ ให้ผลการทดสอบเป็นบวก ส่วนการทดสอบออกซิเดส และอินโดล ให้ผลการทดสอบเป็นลบ

3.3 การศึกษาประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียไอโซเลต

จากการทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียจำนวน 13 ไอโซเลต ได้แก่ CPPES01T2 CSSES08H2 CKNJh11 CKNJh19 OYNH13 OYNH19 OYNH21 OYNH31 SHPS1 SHPS2 SHPS4 HHPS5 และ THPS1 บนอาหาร DSM เลี้ยงแบคทีเรียให้เกิดการสร้างสปอร์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามี 6 ไอโซเลต คือ OYNH31 CPPES01T2 CKNJh11 SHPS1 HHPS5 และ THPS1 มีประสิทธิภาพการสร้างสปอร์สูง 82.09, 74.67, 80.33, 71.12, 79.78 และ 71.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไอโซเลต OYNH31 มีประสิทธิภาพการสร้างสปอร์สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่น ($P \leq 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 6 จากนั้นเลือกทั้ง 6 ไอโซเลต ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสร้างสปอร์ที่สูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ มาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 6 ประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียไอโซเลตบนอาหาร DSM
หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแท่งกราฟ มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.4 การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียไอโซเลต

จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยใช้วิธี disc diffusion ของแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลต ได้แก่ OYNH31 CPPES01T2 CKNJh11 SHPS1 HHPS5 และ THPS1 ซึ่งมีประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ที่สูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบโดยใช้แผ่นดิสก์ยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด คือ แอมพิซิลลิน (10 µg/disc) กานามัยซิน (30 µg/disc) เททราไซคลิน (30 µg/disc) คลอแรมเฟนิคอล (30 µg/disc) อะมอกซีซิลลิน (30 µg/disc) และคลอกซาซิลลิน (1 µg/disc) บนอาหาร MHA พบว่าไอโซเลต CPPES01T2 CKNJh11 และ HHPS5 ที่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 6 ชนิด โดยมีความไวต่อยาปฏิชีวนะเททราไซคลิน คลอแรมเฟนิคอล และคลอกซาซิลลินมากที่สุดทั้ง 3 ไอโซเลต ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งแบคทีเรียของยาปฏิชีวนะมากกว่า 20 มิลลิเมตร ส่วนยาแอมพิซิลลิน กานามัยซิน และอะมอกซีซิลลิน จากทั้ง 3 ไอโซเลต มีบางไอโซเลตที่ไวต่อยาระดับปานกลาง เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 12-19 มิลลิเมตร ส่วนไอโซเลต OYNH31 SHPS1 และ THPS1 พบว่ามีการต้านต่อยาปฏิชีวนะ แอมพิซิลลิน อะมอกซีซิลลิน และ คลอกซาซิลลิน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งน้อยกว่า 11 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียไอโซเลต

แผ่นดิสก์ยาปฏิชีวนะ	ความไวต่อยาปฏิชีวนะ (มิลลิเมตร)						
	B. subtilis ATCC 6633	OYNH31	CPPES01T2	CKNJh11	SHPS1	HHPS5	THPS1
แอมพิซิลลิน (10 µg/disc)	12.83±0.76	6.5±0.87	30.83±0.76	12.67±0.76	7.00±0.50	18.50±0.50	6.50±0.50
กานามัยซิน (30 µg/disc)	22.33±0.58	17.17±0.76	12.83±0.76	21.16±0.76	16.50±0.50	15.83±0.29	13.67±0.29
เททราไซคลิน (30 µg/disc)	27.50±0.50	22.00±1.00	24.67±0.58	24.83±0.76	20.33±1.25	34.33±0.58	19.50±0.87
คลอแรมเฟนิคอล (30 µg/disc)	23.83±0.29	16.83±0.76	22.17±1.04	22.67±0.58	20.67±0.58	20.86±0.81	18.67±0.58
อะมอกซีซิลลิน (30 µg/disc)	21.33±0.58	6.50±0.50	28.33±0.58	13.00±0.50	6.33±0.58	16.00±0.50	8.17±0.57
คลอกซาซิลลิน (1 µg/disc)	34.83±0.76	6.50±0.86	25.33±0.57	26.50±0.87	8.50±0.50	32.50±0.58	6.67±0.58

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน ของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งแบคทีเรียของยาปฏิชีวนะ

แบคทีเรียมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง ≥ 20 มิลลิเมตร)

แบคทีเรียมีความไวต่อยาปฏิชีวนะปานกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 12-19 มิลลิเมตร)

แบคทีเรียมีความต้านต่อยาปฏิชีวนะ (เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง ≤ 11 มิลลิเมตร)

3.5 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

จากผลการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion โดยนำส่วนใสปราศจากเซลล์ของแบคทีเรีย และแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร LB จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ OYNH31 CPPES01T2 CKNJh11 SHPS1 HHPS5 และ THPS1 มาทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบจำนวน 4 สายพันธุ์ โดยแบ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis* ATCC 6633 และ *S. aureus* ATCC 25923 และแบคทีเรียแกรมลบจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *V. parahaemolyticus* ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต คือ OYNH31 CPPES01T2 และ THPS1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยไอโซเลต OYNH31 ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์และเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร LB สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 โดยมีบริเวณการยับยั้ง 9.33±0.16 และ 10.00±0.28 มิลลิเมตร ตามลำดับ CPPES01T2 ที่เลี้ยงในอาหาร LB สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 และ *V. parahaemolyticus* โดยมีบริเวณการยับยั้ง 9.36±0.15 และ 8.97±0.42 มิลลิเมตร THPS1 ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์สามารถยับยั้ง *V. parahaemolyticus* โดยมีบริเวณการยับยั้ง 8.73±0.40 มิลลิเมตร และเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร LB สามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 โดยมีบริเวณการยับยั้ง 9.67±0.57 มิลลิเมตร ส่วนไอโซเลต CKNJh11 SHPS1 และ HHPS5 ไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหาร LB ดังแสดงในตารางที่ 6

3.6 การทดสอบความสามารถในการทนต่อความร้อนและแอลกอฮอล์ของแบคทีเรีย

จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อความร้อนและแอลกอฮอล์ของแบคทีเรีย จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ OYNH31 CPPES01T2 CKNJh11 SHPS1 HHPS5 และ THPS1 พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถทนต่อความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยมีอัตราการรอดชีวิต คือ 72.89±4.68, 80.98±0.59, 83.69±4.25, 76.83±2.19, 72.90±1.00 และ75.56±1.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งอัตราการรอดชีวิตต่อการทนความร้อนแต่ละไอโซเลตไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) การทนต่อแอลกอฮอล์มีอัตราการรอดชีวิต คือ 97.75±1.18, 99.02±0.32, 88.27±1.04, 89.64±0.99, 88.13±0.85 และ 89.52±0.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยไอโซเลต OYNH31 และ CPPES01T2 สามารถทนแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ โดยมีอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุด ($P \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่น ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งบนอาหาร MHA

ไอโซเลต	แบคทีเรีย	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง(mm)				
		B. subtilis ATCC 6633	*S. aureus* ATCC 25923	*E. coli* ATCC 25922	*V. parahaemolyticus*	*P. aeruginosa* ATCC 27853
OYNH31	CFS	9.33±0.16	-	-	-	-
	Cell	10.00±0.28	-	-	-	-
CPPES01T2	CFS	-	-	-	-	-
	Cell	9.36±0.15	-	-	8.97±0.42	-
CKNJh11	CFS	-	-	-	-	-
	Cell	-	-	-	-	-
SHPS1	CFS	-	-	-	-	-
	Cell	-	-	-	-	-
HHPS5	CFS	-	-	-	-	-
	Cell	-	-	-	-	-
THPS1	CFS	-	-	-	9.67±0.57	-
	Cell	-	8.73±0.40	-	-	-
CF		35.12±2.97	23.88±0.83	31.20±1.31	26.82±0.60	33.10±0.96
LB		-	-	-	-	-

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ – หมายถึง ไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย, CFS หมายถึง ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรีย, Cell หมายถึง แบคทีเรียในอาหาร LB, CF หมายถึง ยาปฏิชีวนะไซโปรฟลอกซาซิน ความเข้มข้น 30 µg/ml (ตัวควบคุมบวก), LB หมายถึง อาหาร Luria Bertani broth (ตัวควบคุมลบ)

ตารางที่ 7 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการทนต่อความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส และแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

ความทนทาน	อัตราการรอดชีวิตของสปอร์ (%)					
	OYNH31	CPPES01T2	CKNJh11	SHPS1	HHPS5	THPS1
เอทานอล 70%	97.75±1.18[a]	99.02±0.32[a]	88.27±1.04[b]	89.64±0.99[b]	88.13±0.85[b]	89.52±0.45[b]
ความร้อนที่ 95°C	72.89±4.68	80.98±0.59	83.69±4.25	76.83±2.19	72.90±1.00	75.56±1.95

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน ของอัตราการรอดชีวิตของสปอร์

ตัวอักษร a และ b ที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.7 การทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียไอโซเลต

จากการทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงบนอาหารแข็ง Sheep blood ของแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ OYNH31 CPPES01T2 CKNJh11 SHPS1 HHPS5 และ THPS1 พบว่าแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต คือ CPPES01T2 CKNJh11 และ THPS1 ไม่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดงได้ (γ-hemolysis) โดยไม่พบบริเวณการย่อยเม็ดเลือดรอบโคโลนี ส่วนไอโซเลต OYNH31 และ SHPS1 สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดอย่างสมบูรณ์ (β-hemolysis) โดยโคโลนีบนอาหารแข็ง Sheep blood มีขอบใสซึ่งเป็นบริเวณการย่อยเม็ดเลือดอย่างชัดเจน และพบว่าไอโซเลต HHPS5 สามารถย่อยสลายเม็ดเลือดได้บางส่วน (α-hemolysis) โดยพบบริเวณการย่อยเม็ดเลือดรอบโคโลนีเพียงเล็กน้อย ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียอ้างอิง จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633, *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *V. parahaemolyticus* พบว่า *B. subtilis* ATCC 6633 ไม่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดงได้ ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตได้แก่ คือ CPPES01T2, CKNJh11 และ THPS1 มีผลการทดสอบคล้ายกับ *B. subtilis* ATCC 6633 แสดงว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต อาจไม่ก่อโรคหรือมีโอกาสในการก่อโรคต่ำ (ตารางที่ 8 ภาพที่ 7 และภาพที่ 8) ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต ไปทดสอบในขั้นต่อไป

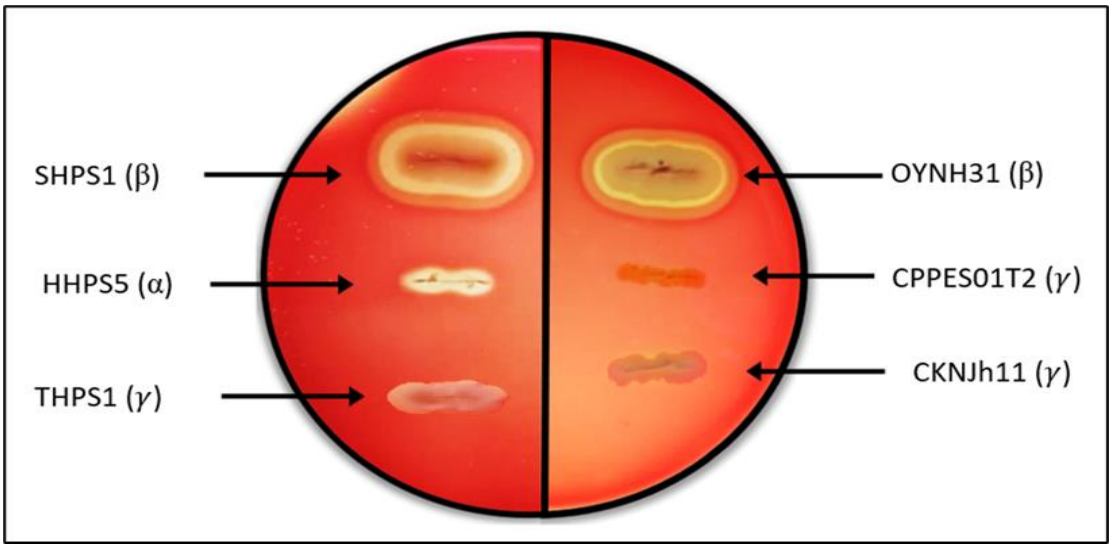
ตารางที่ 8 ความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดบนอาหารแข็ง Sheep blood ของแบคทีเรียไอโซเลต

ตัวอย่าง	ไอโซเลต	การย่อยเม็ดเลือด
Feces of chicken	OYNH31	β
Crustacean Intestine	CPPES01T2	γ
Shrimp pond sludge	CKNJh11	γ
Hot springs soil	SHPS1	β
Hot springs soil	HHPS5	α
Hot springs soil	THPS1	γ

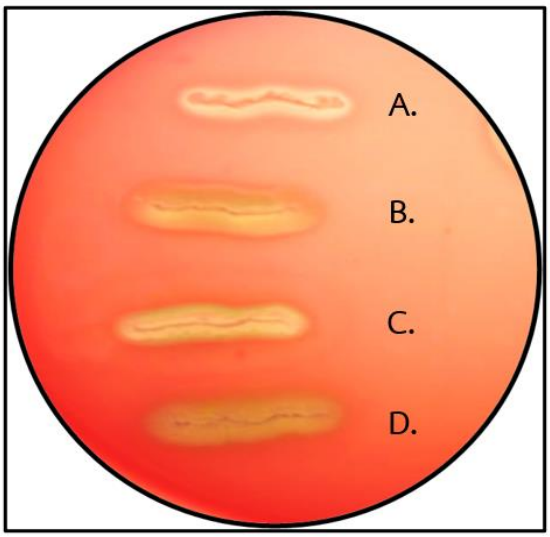
หมายเหตุ : β คือ ระดับการย่อยเม็ดเลือด β - Hemolysis มีการย่อยเม็ดเลือดอย่างสมบูรณ์

α คือ ระดับการย่อยเม็ดเลือด α - Hemolysis มีการย่อยเม็ดเลือดเพียงบางส่วน

γ คือ ระดับการย่อยเม็ดเลือด γ - Hemolysis ไม่มีการย่อยเม็ดเลือด



ภาพที่ 7 การทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียไอโซเลต



ภาพที่ 8 การทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดงของ

(A.) *V. parahaemolyticus* (**β** - Hemolysis)

(B.) *P. aeruginosa* ATCC 27853 (**α** - Hemolysis)

(C.) *S. aureus* ATCC 25923 (**α** - Hemolysis)

(D.) *B. subtilis* ATCC 6633 (**γ** - Hemolysis)

3.8 การทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีของแบคทีเรีย

จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีเป็นเวลา 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ของแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลต ที่มีผลการทดสอบการย่อยเม็ดเลือดเป็น γ-hemolysis ได้แก่ CPPES01T2 CKNJh11 และ THPS1 พบว่าไอโซเลต CKNJh11 และ THPS1 สามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ที่สุด ($P \leq 0.05$) โดยไอโซเลต CKNJh11 มีอัตราการรอดชีวิตที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.1, 0.3 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง คือ 90.36±0.66, 87.32±0.41 และ 84.55±0.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไอโซเลต THPS1 มีอัตราการรอดชีวิตที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.1, 0.3 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง คือ 89.68±0.59, 89.04±1.18 และ 87.33±0.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ($P \leq 0.05$) แม้ในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 ถึง 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยยังมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอโซเลต CPPES01T2 มีอัตราการรอดชีวิตที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.1, 0.3 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง คือ 73.32±1.32, 74.88±0.92 และ 72.84±0.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยยังมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการรอดชีวิตลดลองตามเวลาทั้ง 3 ไอโซเลต (ตารางที่ 9) และการทดสอบการทนกรดในกระเพาะอาหารจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ CPPES01T2 CKNJh11 และ THPS1 พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลต สามารถทนต่อกรดได้ดีแม้ในสภาวะความเป็นกรดสูงถึง pH 2.0 โดยอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลต CKNJh11 มีอัตราการรอดชีวิตที่สภาวะกรด pH 2.0, 2.5 และ 3.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง คือ 82.60±1.16, 85.33±0.39 และ 89.34±0.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไอโซเลต CPPES01T2 มีอัตราการรอดชีวิตที่สภาวะกรด pH 2.0, 2.5 และ 3.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง คือ 77.14±0.43, 78.38±0.63 และ 81.36±0.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไอโซเลต THPS1 มีอัตราการรอดชีวิตที่สภาวะกรด pH 2.0, 2.5 และ 3.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง คือ 75.92±0.73, 78.11±0.31 และ 82.52±0.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยไอโซเลต CKNJh11 สามารถทนต่อสภาวะกรดได้ดีที่สุดที่ pH 2.0, 2.5 และ 3.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่น ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 9 อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียไอโซเลตต่อการทนเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

เกลือน้ำดี	เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย (%)		
		CKNJh11	CPPES01T2	THPS1
0.1%	1	98.28±0.61^{aA}	93.52±0.56^{bA}	97.40±0.25^{aA}
	2	92.50±0.63^{aB}	79.11±4.60^{bB}	96.41±0.77^{aA}
	3	90.36±0.66^{aC}	73.32±1.32^{bC}	89.68±0.59^{aB}
0.3%	1	97.27±0.69^{aA}	91.16±0.50^{cA}	96.22±0.12^{bA}
	2	88.44±5.50^{bB}	79.31±2.82^{cB}	93.74±1.99^{aA}
	3	87.32±0.41^{aB}	74.88±0.92^{bC}	89.04±1.18^{aB}
0.5%	1	94.86±3.92^{A}	88.87±2.38^{A}	93.39±0.44^{A}
	2	87.68±3.72^{aB}	75.17±1.20^{bB}	90.85±0.49^{aB}
	3	84.55±0.91^{aB}	72.84±0.58^{cB}	77.33±0.31^{bC}

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน ของอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย

ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติของอัตราการรอดชีวิตในแต่ละไอโซเลต ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตัวอักษร A, B และ C ที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติของอัตราการรอดชีวิตในแต่ละช่วงเวลา ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 10 อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียไอโซเลตต่อการทนกรดที่ pH 2.0, 2.5 และ 3.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

เพปซิน 0.1%	เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย (%)		
		CKNJh11	CPPES01T2	THPS1
pH 2.0	1	91.31 ± 1.16^{aA}	74.29 ± 0.49^{cB}	77.10 ± 1.86^{b}
	2	81.72 ± 0.46^{aB}	75.85 ± 0.92^{bA}	74.93 ± 0.55^{b}
	3	82.60 ± 1.16^{aB}	77.14 ± 0.43^{bA}	75.92 ± 0.73^{b}
pH 2.5	1	89.93 ± 2.42^{aA}	76.62 ± 0.86^{b}	78.67 ± 0.68^{b}
	2	81.67 ± 1.51^{aC}	75.93 ± 0.35^{b}	77.49 ± 0.67^{b}
	3	85.33 ± 0.39^{aB}	78.38 ± 0.63^{b}	78.11 ± 0.31^{c}
pH 3.0	1	93.97 ± 0.31^{aA}	79.04 ± 1.42^{bB}	79.04 ± 1.11^{bB}
	2	85.19 ± 0.13^{aB}	78.38 ± 0.63^{cB}	80.37 ± 0.49^{bB}
	3	89.34 ± 0.49^{aB}	81.36 ± 0.25^{cA}	82.52 ± 0.12^{bA}

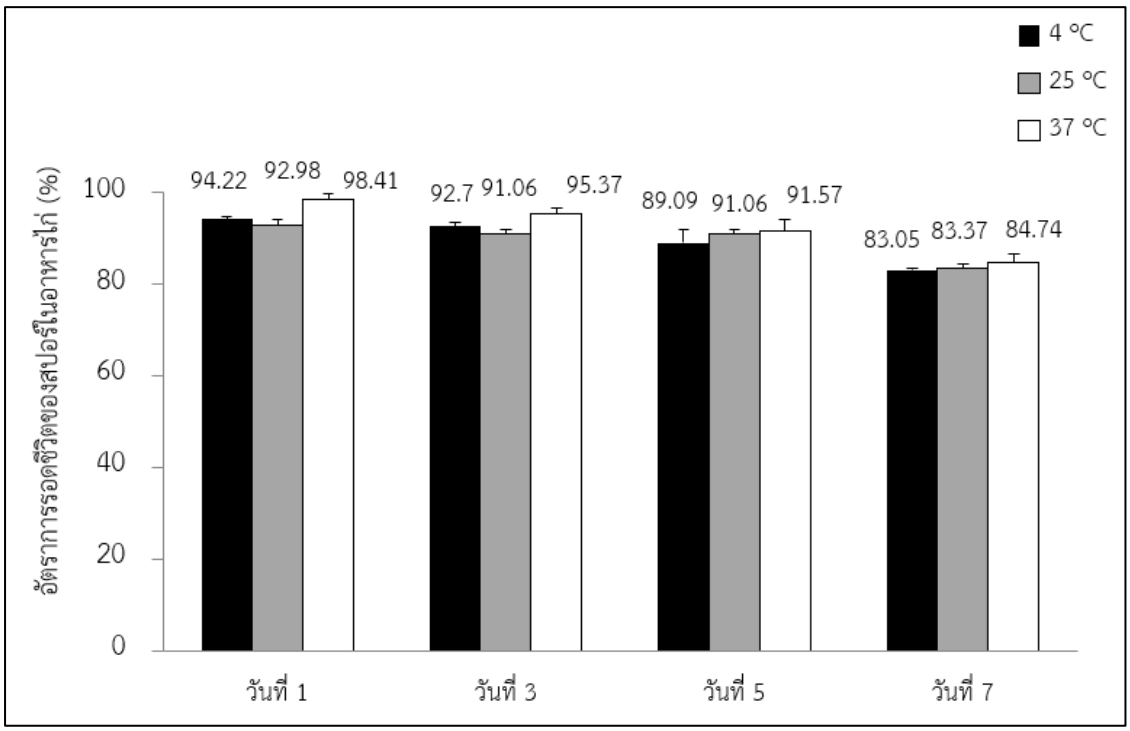
หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน ของอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรีย

ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติของอัตราการรอดชีวิตในแต่ละไอโซเลต ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

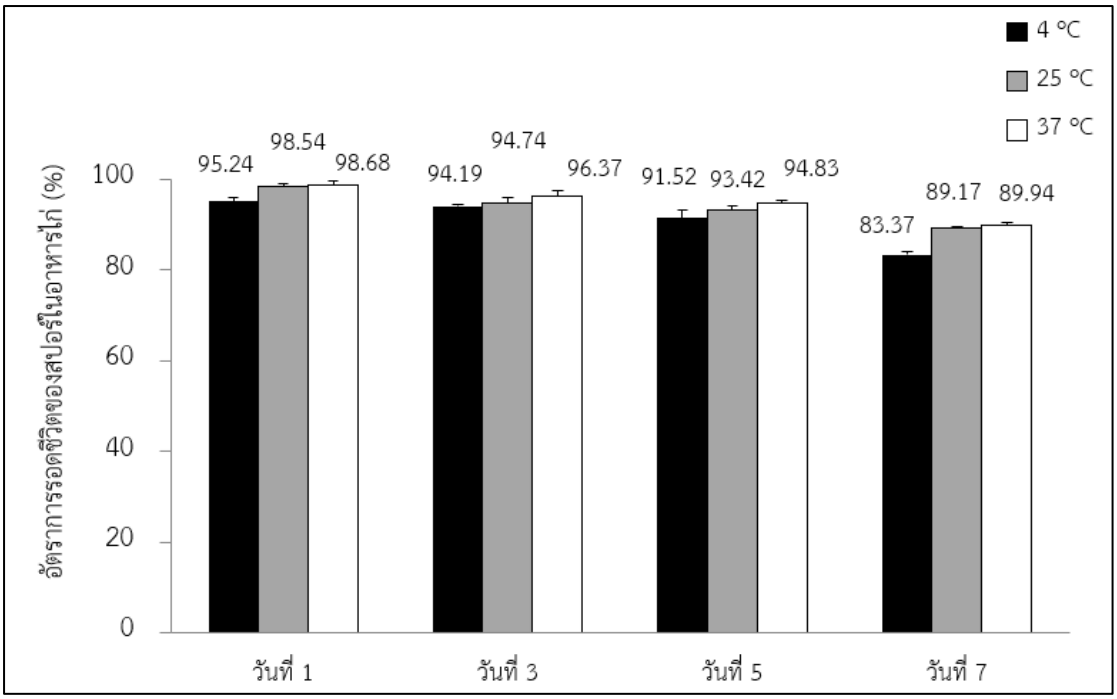
ตัวอักษร A, B และ C ที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติของอัตราการรอดชีวิตในแต่ละช่วงเวลา ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.9 การผสมสปอร์แบคทีเรียในอาหารไก่ไข่ และทดสอบอัตราการรอดชีวิตของสปอร์

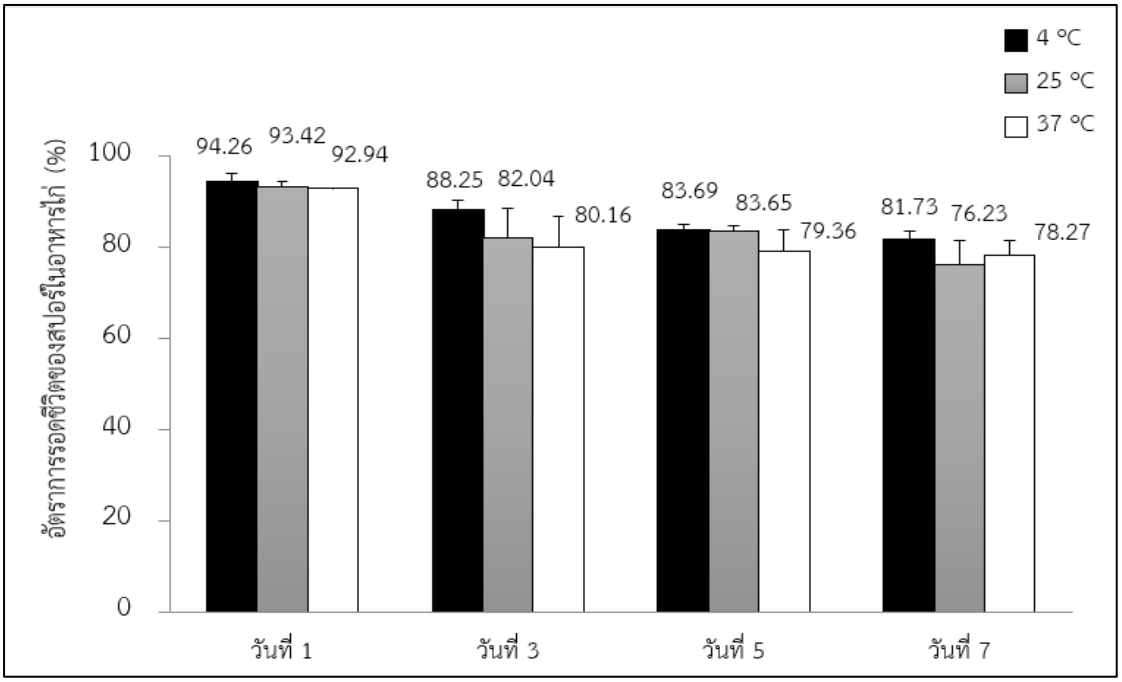
การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของสปอร์เมื่อผสมในอาหารไก่ไข่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างกัน 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต ได้แก่ CPPES01T2 CKNJh11 และ THPS1 จากนั้นตรวจนับจำนวนและคำนวณอัตราการรอดชีวิตของสปอร์แบคทีเรีย พบว่าไอโซเลต CPPES01T2 ปริมาณสปอร์แบคทีเรียลดลง โดยในวันที่ 7 ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส อัตราการรอดชีวิตของสปอร์คือ 83.05, 83.37 และ 84.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 9) ไอโซเลต CKNJh11 ปริมาณสปอร์แบคทีเรียลดลง โดยในวันที่ 7 ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส อัตราการรอดชีวิตของสปอร์คือ 83.37, 89.17 และ 89.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 10) ไอโซเลต THPS1 ปริมาณสปอร์แบคทีเรียลดลง โดยในวันที่ 7 ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส อัตราการรอดชีวิตของสปอร์คือ 81.73, 76.23 และ 78.27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 11) โดยไอโซเลต CPPES01T2 และ CKNJh11 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์สูงสุดเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วนไอโซเลต THPS1 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์สูงสุดเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 9 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์แบคทีเรียไอโซเลต CPPES01T2 เมื่อผสมในอาหารไก่ไข่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 10 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์แบคทีเรียไอโซเลต CKNJh11 เมื่อผสมในอาหารไก่ไข่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 11 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์แบคทีเรียไอโซเลต THPS1 เมื่อผสมในอาหารไก่ไข่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบคุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียไอโซเลต

ไอโซเลต	การสร้างสปอร์ (%)	ความไวต่อยาปฏิชีวนะ	การยับยั้งแบคทีเรีย	การย่อยเม็ดเลือด	ความทนทาน (%)				อัตราการรอดชีวิตของสปอร์ในอาหารไก่ (%)		
					กรด	เกลือน้ำดี	ความร้อน	เอทานอล	4 °C	25 °C	37 °C
CPPES01T2	74.67[b]	S	*B. subtilis* *V. parahaemolyticus*	γ	>74	>72	80.98[b]	99.02[a]	83.05[a]	83.37[b]	84.74[b]
CKNJh11	80.33[a]	S	-	γ	>81	>84	83.69[a]	88.27[b]	83.37[a]	89.17[a]	89.94[a]
THPS1	71.42[b]	M	*S. aureus* *V. parahaemolyticus*	γ	>74	>77	75.56[b]	89.52[b]	81.73[b]	76.23[b]	78.27[b]

หมายเหตุ : S หมายถึง แบคทีเรียมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ, M หมายถึง แบคทีเรียมีความไวต่อยาปฏิชีวนะปานกลาง

- หมายถึง ไม่พบการยับยั้งแบคทีเรีย, γ หมายถึง ระดับการย่อยเม็ดเลือด γ - Hemolysis ไม่มีการย่อยเม็ดเลือด

ตัวอักษร a และ b ที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน พบว่า 3 ไอโซเลตที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกที่ดี ได้แก่ ไอโซเลต CPPES01T2 CKNJh11 และ THPS1 ในการทดสอบขั้นต่อไปก่อนการทดลองในไก่ จึงต้องเลือกเพียง 1 ไอโซเลต เพื่อนำไปทดสอบการห่อหุ้มสปอร์และจำแนกแบคทีเรียไอโซเลตระดับสปีชีส์โดยการตรวจสอบยีน วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดย 16S rDNA จากการเปรียบเทียบคุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต พบว่าการสร้างสปอร์ ไอโซเลต CKNJh11 มีประสิทธิภาพการสร้างสปอร์สูงสุด 80.33 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าไอโซเลต CKNJh11 และ CPPES01T2 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะที่สุด ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย พบว่าไอโซเลต THPS1 สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *V. parahaemolyticus* ไอโซเลต CPPES01T2 สามารถยับยั้ง *B. subtilis* และ *V. parahaemolyticus* ทดสอบการย่อยเม็ดเลือด พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลต ไม่สามารถย่อยเม็ดเลือดได้ ทดสอบความทนทานต่อกรดในกระเพาะอาหาร เกลือน้ำดี ความร้อน และแอลกอฮอล์ พบว่าไอโซเลต CKNJh11 สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร เกลือน้ำดี และความร้อนดีที่สุด โดยทนต่อกรดมีอัตรารอดชีวิตสูงกว่า 81 เปอร์เซ็นต์ ทนต่อเกลือน้ำดีโดยมีอัตรารอดชีวิตสูงกว่า 84 เปอร์เซ็นต์ และทนต่อความร้อนโดยมีอัตรารอดชีวิต 83.69 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการทดสอบความทนทานต่อเอทานอล พบว่าไอโซเลต CPPES01T2 มีอัตรารอดชีวิตสูงที่สุด 99.02 เปอร์เซ็นต์ และการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของสปอร์เมื่อผสมในอาหารไก่ เก็บที่อุณภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าไอโซเลต CKNJh11 มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดที่อุณภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส โดยมีอัตรารอดชีวิต 83.37, 89.17 และ 89.94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 11) ดังนั้นจากผลการเปรียบเทียบคุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต จึงเลือกไอโซเลต CKNJh11 ซึ่งมีประสิทธิภาพการสร้างสปอร์สูงสุด มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ ไม่สามารถย่อยเม็ดเลือดได้ ความทนทานต่อกรดในกระเพาะอาหาร เกลือน้ำดี ความร้อน และมีอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ในอาหารไก่สูงสุดที่อุณภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส มาทดสอบในขั้นตอนต่อไปก่อนการทดลองในไก่

3.10 การวัดประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์ การปลดปล่อยเซลล์ ขนาดของเม็ดเจล และทดสอบคุณสมบัติการรอดชีวิตของสปอร์ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนต

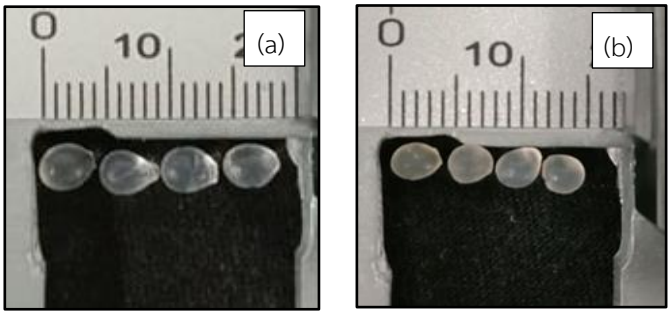
จากการเลือกแบคทีเรียไอโซเลต CKNJh11 มาเลี้ยงให้เกิดการผลิตสปอร์ และนำสปอร์มาห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) วัดขนาดของเม็ดเจล ประสิทธิภาพการห่อหุ้ม การปลดปล่อยเซลล์ และทดสอบคุณสมบัติการรอดชีวิตต่อกรดในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดี การรอดชีวิตของสปอร์ที่ตรึงด้วยโซเดียมแอลจิเนตทั้งก่อนและหลังการทำให้แห้งด้วยความร้อนที่ 40-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง พบว่าขนาดของเม็ดเจลแบบเปียกมีขนาดเส้นผ่าน

ศูนย์กลางเฉลี่ย คือ 4.7±0.57 มิลลิเมตร และหลังการทำให้แห้งเม็ดเจลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย คือ 3.8±0.27 มิลลิเมตร (ภาพที่ 12) ประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์สปอร์แบคทีเรียก่อนการทำให้แห้งด้วยความร้อนมีประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์เฉลี่ย 85.03±4.36 เปอร์เซ็นต์ และหลังการทำเม็ดเจลให้แห้งด้วยความร้อน ประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์เฉลี่ย คือ 87.08±2.78 เปอร์เซ็นต์ การวัดอัตราการปลดปล่อยเซลล์ออกจากเม็ดเจลก่อนการทำให้แห้งด้วยความร้อนมีอัตราการปลดปล่อยเซลล์เฉลี่ย 87.37±5.79 เปอร์เซ็นต์ และหลังการทำเม็ดเจลให้แห้งด้วยความร้อนมีอัตราการปลดปล่อยเซลล์เฉลี่ย 89.65±2.27 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 อัตราการปลดปล่อยเซลล์ ประสิทธิภาพการห่อหุ้ม ขนาดของเม็ดเจล และการทนต่อกรดเกลือน้ำดีของเม็ดแอลจิเนตแบบเปียกและแบบแห้งของไอโซเลต CKNJh11

คุณสมบัติของเม็ดเจล	สปอร์อิสระ	เม็ดแอลจิเนต	
		แบบเปียก	แบบแห้ง
Diameter (mm)	-	4.7±0.57[a]	3.8±0.27[b]
Encapsulation yield (%)	-	85.03±4.36	87.08±2.78
Cell release (%)	-	87.37±5.79	89.65±2.27
Survival rate (%)			
Bile salt 0.1%	92.50±0.63[b]	89.49±0.65[c]	94.55±1.25[a]
Bile salt 0.3%	88.44±5.50[c]	91.51±2.56[b]	94.81±2.56[a]
Bile salt 0.5%	87.68±3.72[a]	81.74±3.49[b]	91.86±0.51[a]
Pepsin pH 2.0	81.72±0.46[c]	84.59±0.74[b]	89.27±1.38[a]
Pepsin pH 2.5	81.67±1.51[b]	90.44±3.17[a]	92.32±1.67[a]
Pepsin pH 3.0	85.19±0.13[c]	91.71±1.54[b]	94.72±0.31[a]

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน ของประสิทธิภาพสปอร์หลังห่อหุ้ม
ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

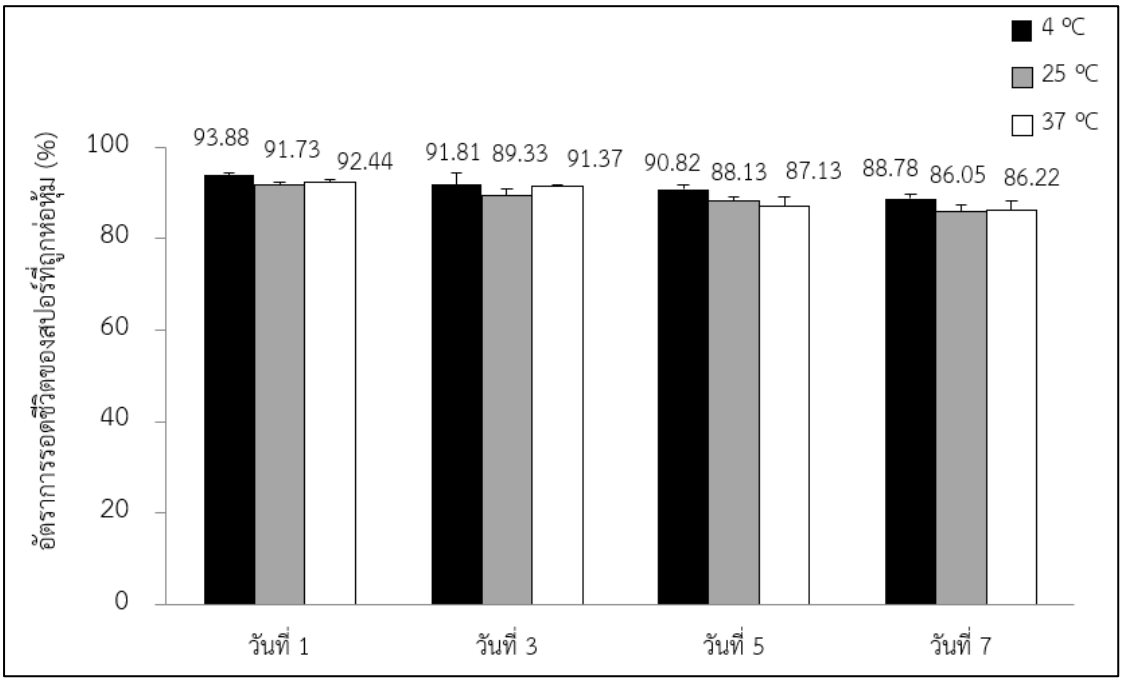


ภาพที่ 12 ลักษณะเม็ดเจลแอลจิเนตที่ห่อหุ้มสปอร์ด้วย 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โซเดียมแอลจิเนต (a) เม็ดเจลแอลจิเนตแบบเปียก (b) เม็ดเจลแอลจิเนตแบบแห้ง

จากการทดสอบคุณสมบัติการทนต่อกรดในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดีของสปอร์ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตทั้งก่อนและหลังการทำให้แห้งด้วยความร้อน พบว่าที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดี 0.1, 0.3 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เม็ดเจลแบบแห้งจะมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงที่สุดคือ 94.55±1.25, 94.81±2.56 และ 91.86±0.51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการทนกรดในกระเพาะอาหารของสปอร์ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ pH 2.0, 2.5 และ 3.0 เม็ดเจลแบบแห้งจะมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงที่สุดคือ 89.27±1.38, 92.32±1.67 และ 94.72±0.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

3.11 การทดสอบอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตในอาหารไก่ไข่

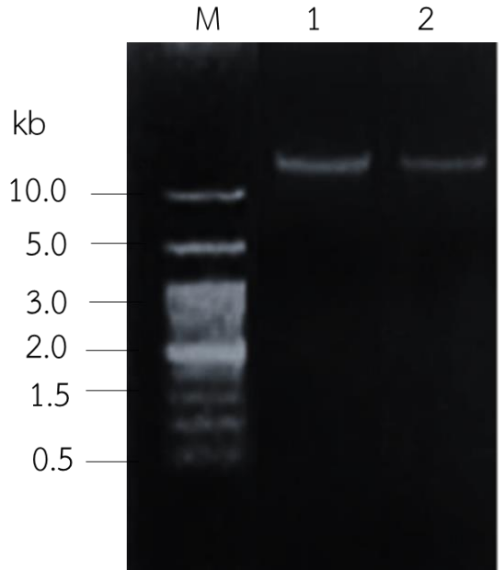
จากการเลือกแบคทีเรียไอโซเลต CKNJh11 นำสปอร์มาห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) นำมาผสมในอาหารไก่ ตรวจสอบการรอดชีวิตของสปอร์โดยนำอาหารมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน พบว่าไอโซเลต CKNJh11 หลังจากห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตและนำมาผสมกับอาหารไก่ พบว่าปริมาณสปอร์แบคทีเรียลดลง เมื่อเก็บอาหารไก่ที่ผสมเม็ดเจลสปอร์แบคทีเรียที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 พบว่าอัตราการรอดชีวิตของสปอร์คือ 93.88, 91.81, 90.82 และ 88.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บอาหารไก่ที่ผสมเม็ดเจลสปอร์แบคทีเรียที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 พบว่าอัตราการรอดชีวิตของสปอร์คือ 91.73, 89.33, 88.13 และ 86.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเก็บอาหารไก่ที่ผสมเม็ดเจลสปอร์แบคทีเรียที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในวันที่ 1, 3, 5 และ 7 พบว่าอัตราการรอดชีวิตของสปอร์คือ 92.44, 91.37, 87.13 และ 86.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 13 อัตราการรอดชีวิตของสปอร์แบคทีเรียไอโซเลต CKNJh11 หลังห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตเมื่อผสมในอาหารไก่ไข่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.12 การจำแนกแบคทีเรียไอโซเลตระดับสปีชีส์โดยการตรวจสอบยีนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดย 16S rDNA

จากผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณ และเชิงคุณภาพของดีเอ็นเอจากแบคทีเรียไอโซเลต CKNJh11 พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต CKNJh11 เมื่อวัดปริมาณดีเอ็นเอที่ค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ต่อค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอเท่ากับ 1495.7 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เมื่อนำดีเอ็นเอมาแยกขนาดบนเจลอะกาโรส (Agarose gel) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที พบดีเอ็นเอของแบคทีเรียไอโซเลต CKNJh11 ในเลนส์ที่ 1 และพบดีเอ็นเอของ *B. subtilis* ATCC 6633 ในเลนส์ที่ 2 ดังแสดงในภาพที่ 14



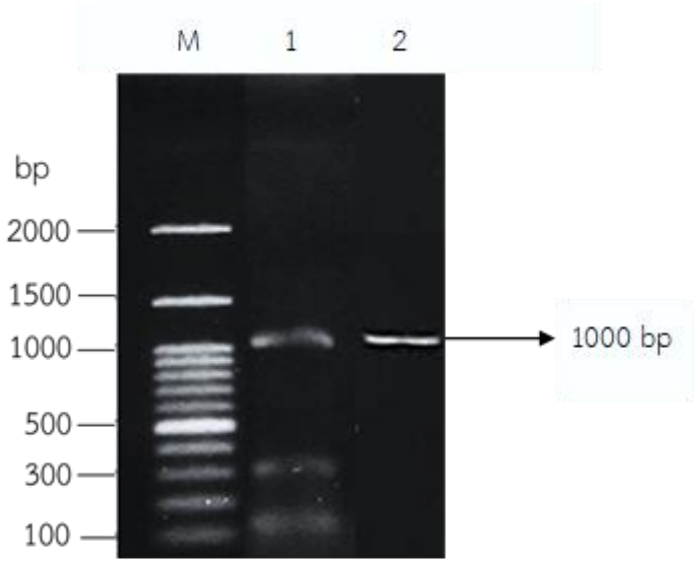
ภาพที่ 14 ผลการแยกดีเอ็นเอบนแผ่นอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในการวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอจากแบคทีเรียไอโซเลต CKNJh11

M คือ 1kb DNA Ladder (0.5-10.0 kb)

1 คือ ดีเอ็นเอของ ไอโซเลต CKNJh11

2 คือ ดีเอ็นเอของ *B. subtilis* ATCC 6633

จากผลการวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ เมื่อเพิ่มปริมาณยีน *gyrA* ซึ่งเป็นยีนที่ใช้จัดจำแนกแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสด้วยไพรเมอร์ gyrA-F:5'-CAG TCA GGA AAT GCG TAC GTC CTT-3' และ gyrA-R: 5'-CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT-3' เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแบคทีเรียไอโซเลต CKNJh11 มาแยกขนาดบนแผ่นอะกาโรส (Agarose gel) ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *gyrA* จากแบคทีเรียไอโซเลต CKNJh11 ในเลนส์ที่ 1 มีขนาดเท่ากับ 1000 คู่เบส (bp) และพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *gyrA* จาก *B. subtilis* ATCC 6633 ในเลนส์ที่ 2 มีขนาดเท่ากับ 1000 คู่เบส (bp) ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากแบคทีเรียไอโซเลต CKNJh11 มีขนาดเท่ากับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ *B. subtilis* ATCC 6633 ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ผลการแยกผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บนแผ่นอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในการวิเคราะห์ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแบคทีเรียไอโซเลต CKNJh11

หมายเหตุ : M คือ 1kb DNA Ladder (0.1-2.0 kb)

1 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ของไอโซเลต CKNJh11

2 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ *B. subtilis* ATCC 6633

จากการนำแบคทีเรียไอโซเลต CKNJh11 ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 16S rDNA ที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (Biotech) จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าไอโซเลต CKNJh11 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 16S rDNA คล้ายกับ *Bacillus aryabhattai* B8W22 โดยมีความคล้ายคลึงกันถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 13 ดังนั้นจึงนำไอโซเลต CKNJh11 ซึ่งเป็น *B. aryabhattai* มาใช้เป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารไก่ไข่ต่อไป

ตารางที่ 13 ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI ของไอโซเลต CKNJh11

Rank	Name	Strain	Authors	Pairwise Similarity (%)	Mismatch/ Total nt.
1	*Bacillus aryabhattai*	B8W22	Shivaji et al. 2009	100.00	0/1474
2	*Bacillus megaterium*	NBRC 15308	de Bary 1884	99.86	2/1474
3	*Bacillus flexus*	NBRC 15715	(ex Batchelor 1919) Priest et al. 1989	98.85	17/1474
4	*Bacillus qingshengii*	G19	Xi et al. 2014	98.24	25/1420
5	*Bacillus paraflexus*	RC2	Chandna et al. 2013	97.83	30/1381
6	*Bacillus iocasae*	S36	Wang et al. 2017	96.46	52/1471
7	*Bacillus cohnii*	NBRC 15565	Spanka and Fritze 1993	96.13	57/1474
8	*Bacillus pocheonensis*	Gsoil 420	Ten et al. 2007	96.13	57/1472
9	*Falsibacillus pallidus*	DSM 25281	(Zhou et al. 2008) Zhou et al. 200	96.13	57/1472
10	*Bacillus koreensis*	DSM 16467	Lim et al. 2006	96.00	59/1474
11	*Bacillus oceanisediminis*	H2	Zhang et al. 2010	95.91	57/1393
12	*Bacillus herbersteinensis*	D-1-5a	Wieser et al. 2005	95.90	60/1462
13	*Bacillus huizhouensis*	GSS03	Li et al. 2014	95.89	60/1459
14	*Bacillus depressus*	BZ1	Wei et al. 2016	95.86	60/1449
15	*Bacillus bataviensis*	LMG 21833	Heyrman et al. 2004	95.86	61/1472

ตารางที่ 13 (ต่อ) ข้อมูลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI ของไอโซเลต CKNJh11

Rank	Name	Strain	Authors	Pairwise Similarity (%)	Mismatch/ Total nt.
16	*Bacillus asahii*	MA001	Yumoto et al. 2004	95.86	61/1472
17	*Bacillus circulans*	ATCC 4513	Jordan 1890	95.85	61/1469
18	*Bacillus cucumis*	AP-6	Kämpfer et al. 2016	95.80	61/1451
19	*Bacillus idriensis*	SMC 4352-2	Ko et al. 2006	95.79	60/1425
20	*Bacillus oryzisoli*	1DS3-10	Zhang et al. 2016	95.79	62/1472
21	*Bacillus soli*	NBRC 102451	Heyrman et al. 2004	95.72	63/1472
22	*Bacillus kochii*	WCC 4582	Seiler et al. 2012	95.70	63/1466
23	*Bacillus purgationiresistens*	DS22	Vaz-Moreira et al. 2012	95.68	62/1435
24	*Bacillus drentensis*	LMG 21831	Heyrman et al. 2004	95.67	61/1408
25	*Bacillus halmapalus*	DSM 8723	Nielsen et al. 1995	95.65	64/1472
26	*Bacillus butanolivorans*	DSM 18926	Kuisiene et al. 2008	95.65	64/1472
27	*Bacillus eiseniae*	A1-2	Hong et al. 2012	95.65	64/1472
28	*Bacillus tianshenii*	YIM M13235	Jiang et al. 2014	95.65	64/1472
29	*Bacillus nealsonii*	DSM 15077	Venkateswaran et al. 2003	95.65	64/1470
30	*Bacillus zhanjiangensis*	JSM 099021	Chen et al. 2012	95.58	65/1472

3.13 ผลของการเสริมโพรไบโอติกในอาหารไก่ไข่ ต่อสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพไข่

จากการเสริมโพรไบโอติกในอาหารไก่ไข่ ต่อสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพไข่เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าการเสริมโพรไบโอติกในอาหารไก่ไข่รูปแบบสปอร์ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ระดับ 10^6 สปอร์ มีแนวโน้มทำให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตไข่และมวลไข่เพิ่มขึ้น ในช่วงสัปดาห์ที่ 23-25 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่เสริมสปอร์อิสระที่ระดับ 10^6 และ 10^8 สปอร์ ($P \leq 0.05$) โดยทำให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตไข่สูงถึง 80.48±2.9 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตไข่เท่ากับ 69.53±4.59 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงสัปดาห์ที่ 23-25 และทำให้มวลไข่เพิ่มขึ้นสูงถึง 43.67±2.88 กรัมต่อวัน ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีมวลไข่เท่ากับ 36.57±3.25 กรัมต่อวัน ในช่วงสัปดาห์ที่ 23-25 ของการทดลอง แต่การเสริมโพรไบโอติกในอาหารที่ระดับต่าง ๆ ทั้งแบบสปอร์อิสระ และสปอร์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตไม่มีผลต่อสมรรถภาพการผลิตอื่น ๆ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว น้ำหนักไข่ ปริมาณอาหารที่กิน และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นผลผลิตไข่ ($P > 0.05$) ดังแสดงตารางที่ 14 ในด้านคุณภาพไข่ พบว่าการเสริมโพรไบโอติกในอาหารไก่ไข่รูปแบบสปอร์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ระดับ 10^6 สปอร์เป็นเวลา 6 สัปดาห์ มีแนวโน้มทำให้น้ำหนักเปลือกไข่เพิ่มขึ้นสูงถึง 6.33±0.44 กรัม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P \leq 0.05$) ซึ่งมีน้ำหนักเปลือกไข่เท่ากับ 5.52±0.47 กรัม แต่การเสริมโพรไบโอติกในอาหารที่ระดับต่าง ๆ ทั้งแบบสปอร์อิสระ และสปอร์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตไม่มีผลต่อคุณภาพไข่อื่น ๆ ได้แก่ น้ำหนักไข่ ความแข็งแรงของเปลือกไข่ ความหนาของเปลือก เปอร์เซ็นต์เปลือกไข่ น้ำหนักไข่แดง สีไข่แดง น้ำหนักไข่ขาว และความสดไข่ขาว ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 14 ผลของการเสริมโพรไบโอติกในอาหารต่อสมรรถภาพการผลิตของไก่ไข่เป็นเวลา 6 สัปดาห์

Parameters	Treatments					SEM	*P*-value
	Control (0 spore)	Free spore $1x10^6$ Spores	Free spore $1x10^8$ Spores	Alginate $1x10^6$ Spores	Alginate $1x10^8$ Spores		
Body weight changes (g)	11.9±0.08	17.2±0.13	-14.4±0.12	55.7±0.09	-14.1±0.14	0.11	0.631
Egg production (%)							
23-25 week	69.53±4.59^{c}	71.91±2.19^{bc}	77.14±3.78^{b}	80.48±2.9^{a}	65.17±4.48^{c}	6.44	0.004
26-28 week	73.82±4.36	66.78±4.36	70.48±1.86	69.88±7.32	74.36±2.33	4.82	0.309
23-28 week	71.67±4.64	69.34±4.37	73.81±4.52	75.18±7.66	69.76±5.96	5.66	0.323
Egg weight (g)							
23-25 week	52.55±1.28	52.88±1.58	49.59±1.90	54.23±1.64	52.39±1.05	2.03	0.052
26-28 week	54.21±0.29	54.36±0.95	52.01±1.35	53.29±0.35	53.39±0.52	1.10	0.081
23-28 week	53.38±1.23	53.62±1.43	50.80±1.98	53.76±1.18	52.89±0.92	1.70	0.107

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน ของสมรรถภาพการผลิตของไก่ไข่

ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 14 (ต่อ) ผลของการเสริมโพรไบโอติกในอาหารต่อสมรรถภาพการผลิตของไก่ไข่เป็นเวลา 6 สัปดาห์

Parameters	Treatments					SEM	*P*-value
	Control (0 spore)	Free spore $1x10^6$ Spores	Free spore $1x10^8$ Spores	Alginate $1x10^6$ Spores	Alginate $1x10^8$ Spores		
Egg mass (g/hen/day)							
23-25 week	36.57±3.25[b]	38.03±0.44[b]	38.22±1.01[b]	43.67±2.88[a]	33.17±3.00[b]	3.83	0.009
26-28 week	40.02±2.56	36.27±1.99	36.66±1.77	37.22±3.69	39.71±1.39	2.61	0.251
23-28 week	38.29±3.22	37.15±1.61	37.44±1.54	40.45±4.61	35.93±3.68	3.22	0.324
Feed intake (g/day)							
23-25 week	62.71±7.08	53.69±13.11	63.24±7.67	52.81±6.91	60.52±13.3	9.69	0.588
26-28 week	45.63±1.31	47.23±3.97	63.46±6.41	48.51±11.02	49.69±8.18	8.98	0.061
23-28 week	54.17±10.40	50.46±9.36	63.35±6.32	50.16±8.72	55.10±11.56	10.02	0.139
Feed efficiency (g of egg mass / g of feed consumed)							
23-25 week	1.73±0.33	1.41±0.36	1.65±0.17	1.22±0.22	1.80±0.51	0.36	0.269
26-28 week	1.14±0.09	1.29±0.12	1.72±0.09	1.30±0.43	1.26±0.25	0.29	0.092
23-28 week	1.43±0.38	1.36±0.25	1.69±0.13	1.26±0.31	1.53±0.47	0.34	0.231

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน ของสมรรถภาพการผลิตของไก่ไข่

ตัวอักษร a และ b ที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 15 ผลของการเสริมโพรไบโอติกในอาหารต่อคุณภาพไข่เป็นเวลา 6 สัปดาห์

Parameters	Treatments					SEM	*P*-value
	Control (0 spore)	Free spore $1x10^6$ Spores	Free spore $1x10^8$ Spores	Alginate $1x10^6$ Spores	Alginate $1x10^8$ Spores		
Egg weight (g)	54.28±3.80	54.40±5.56	50.83±2.67	53.48±4.32	53.24±3.82	4.19	0.372
Eggshell strength (kg/cm^2)	4.29±0.97	3.80±1.35	3.92±1.00	4.17±0.62	4.46±0.75	0.99	0.664
Eggshell thickness (mm)	0.35±0.04	0.34±0.05	0.32±0.04	0.36±0.02	0.36±0.01	0.03	0.173
Eggshell weight (g)	5.52±0.47^{b}	6.03±1.06^{ab}	6.12±0.52^{ab}	6.33±0.44^{a}	6.14±0.41^{ab}	0.71	0.050
Eggshell percent (%)	11.25±0.74	11.56±0.27	11.69±0.45	11.16±0.45	11.54±0.53	0.52	0.350
Yolk weight (g)	12.28±0.83	12.73±1.22	11.79±0.76	12.18±1.26	12.10±1.24	1.06	0.427
Yolk color score	8.16±0.85	8.62±1.09	8.09±1.29	7.50±0.71	8.04±0.88	1.02	0.331
Albumen weight (g)	35.52±0.87	35.44±0.85	33.53±1.45	35.67±1.03	35.07±0.62	1.23	0.106
Haugh unit	90.48±11.95	83.51±15.45	85.96±16.84	95.25±4.78	87.39±17.14	14.14	0.561

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน ของคุณภาพไข่ไก่

ตัวอักษร a และ b ที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Haugh unit = 100 x log (H-1.7W$^{0.37}$+7.6) ; H คือ ความสูงของไข่ขาว ; W คือ น้ำหนักไข่

3.14 ผลการเสริมโพรไบโอติกต่อจำนวนแบคทีเรีย *Salmonella* sp., *Escherichia coli* และแบคทีเรียกรดแล็กติกในมูลไก่

จากการเสริมโพรไบโอติกในอาหารไก่ไข่ต่อจำนวนแบคทีเรีย *Salmonella* sp., *E. coli* และแบคทีเรียกรดแล็กติกในมูลไก่ โดย *Salmonella* sp. และ *E. coli* เป็นตัวแทนแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค จากการทดลอง พบว่าการเสริมโพรไบโอติกในอาหารที่ระดับต่าง ๆ ทั้งแบบสปอร์อิสระและสปอร์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตมีผลทำให้จำนวนของ *Salmonella* sp. และ *E. coli* ในมูลไก่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม *(P≤0.05)* โดยในกลุ่มควบคุมจะมีปริมาณของ *Salmonella* sp. ในมูลเท่ากับ 7.07±0.11 log10 CFU/g เมื่อเสริมโพรไบโอติกเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยเสริมสปอร์อิสระที่ระดับ 10^6 และ 10^8 สปอร์ เสริมสปอร์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ระดับ 10^6 และ 10^8 สปอร์ ทำให้ลดปริมาณของ *Salmonella* sp. ในมูลอยู่ที่ 5.36±0.10, 6.47±0.41, 6.51±0.15 และ 6.53±0.49 log10 CFU/g ตามลำดับ และปริมาณของ *E. coli* ในมูลของกลุ่มควบคุมเท่ากับ 7.20±0.24 log10 CFU/g เมื่อเสริมโพรไบโอติกเป็นเวลา 6 สัปดาห์ โดยเสริมสปอร์อิสระที่ระดับ 10^6 และ 10^8 สปอร์ เสริมสปอร์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ระดับ 10^6 และ 10^8 สปอร์ ทำให้ลดปริมาณของ *E. coli* ในมูลอยู่ที่ 6.69±0.13, 6.75±0.21, 6.35±0.07 และ 6.68±0.34 log10 CFU/g ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นตัวแทนแบคทีเรียแกรมบวกที่มีประโยชน์ต่อร่างกายและอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร โดยในกลุ่มควบคุมจะมีปริมาณของแบคทีเรียกรดแล็กติกเท่ากับ 8.01±0.04 log10 CFU/g จากผลการทดลอง พบว่าการเสริมโพรไบโอติกในอาหารที่ระดับต่าง ๆ ทั้งแบบสปอร์อิสระและสปอร์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตมีผลทำให้จำนวนของแบคทีเรียกรดแล็กติกในมูลไก่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P≤0.05$) การเสริมสปอร์อิสระที่ระดับ 10^6 และ 10^8 สปอร์ เสริมสปอร์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ระดับ 10^6 และ 10^8 สปอร์ ทำให้เพิ่มปริมาณของแบคทีเรียกรดแล็กติกอยู่ที่ 8.35±0.09, 8.29±0.10, 8.29±0.02 และ 8.42±0.05 log10 CFU/g ตามลำดับ โดยการเสริมแบบสปอร์อิสระ และสปอร์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ระดับ 10^6 และ 10^8 สปอร์ ไม่มีความแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 ผลของการเสริมโพรไบโอติกต่อปริมาณ *Salmonella* sp., *Escherichia coli* และแบคทีเรียกรดแล็กติกในมูลไก่ (log10 CFU/g of feces)

Parameters	Treatments					SEM	*P*-value
	Control (0 spore)	Free spore $1x10^6$ Spores	Free spore $1x10^8$ Spores	Alginate $1x10^6$ Spores	Alginate $1x10^8$ Spores		
Salmonella spp.	7.07±0.11[a]	5.36±0.10[c]	6.47±0.41[b]	6.51±0.15[b]	6.53±0.49[b]	0.632	0.001
Escherichia coli	7.20±0.24[a]	6.69±0.13[b]	6.75±0.21[b]	6.35±0.07[b]	6.68±0.34[b]	0.338	0.010
Lactic acid bacteria	8.01±0.04[b]	8.35±0.09[a]	8.29±0.10[a]	8.29±0.02[a]	8.42±0.05[a]	0.154	0.000

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน ของจำนวนแบคทีเรียในมูลไก่

ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 4
วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างสปอร์และสารสีจากลำไส้ครัสเตเซียน ได้แก่ กุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*) ปูม้า (*Portunus pelagicus*) และปูดำ (*Scylla serrata*) จำนวน 4 ไอโซเลต จากการคัดแยกของ ทศพร (2558) และ ปิยวรรณ (2560) ตัวอย่างดินบ่อกุ้ง จำนวน 3 ไอโซเลต จากการคัดแยกของชนิกานต์และณิชารีย์ (2560) ได้แก่ ไอโซเลต SPMET10T1 SPMES06T1 CPPES01T2 CSSES08H2 CKNJh11 CKNJh19 และ CKNJh20 นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าไอโซเลต CPPES01T2 CSSES08H2 CKNJh11 และ CKNJh19 มีคุณสมบัติคล้ายกับแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส คือ ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่ง และได้คัดแยกแบคทีเรียเพิ่มเติมจากตัวอย่างมูลไก่ และดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อน นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากตัวอย่างมูลไก่พบแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต คือ OYNH13 OYNH19 OYNH21 และ OYNH31 จากตัวอย่างดินบ่อน้ำพุร้อนพบแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต คือ SHPS1 SHPS2 SHPS4 HHPS5 และ THPS1 ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส และนำทั้ง 13 ไอโซเลต มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ การทดสอบแคทาเลส ออกซิเดส Motility อินโดล และ ไฮโดรลิซิสของแป้ง ผลการทดสอบพบว่า แบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถเคลื่อนที่ได้ ทดสอบการย่อยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และการย่อยแป้งให้ผลเป็นบวก ทดสอบการผลิตเอนไซม์ไซโทโครมออกซิเดส และการทดสอบอินโดล ให้ผลเป็นลบ ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวตรงกับลักษณะของแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ngo และคณะ (2016) ที่ได้คัดแยกแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส จากลำไส้ของกุ้งกุลาดำ และกุ้งขาว ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และรูปร่างเป็นแท่ง เมื่อทดสอบทางชีวเคมี พบว่าสามารถย่อยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) และย่อยแป้งได้ และไม่ผลิตเอนไซม์ไซโทโครมออกซิเดส และการทดสอบอินโดล ให้ผลเป็นลบ ในงานวิจัยของ Mohammad และคณะ (2017) ที่คัดแยกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียจากบ่อน้ำพุร้อนในจอร์แดน โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี และจำแนกสายพันธุ์ได้เป็น *B. licheniformis* ในงานวิจัยของ Luong และคณะ (2018) ที่ได้คัดแยกแบคทีเรียที่สร้างสปอร์จากทางเดินอาหารของไก่ สามารถคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส ได้แก่ *B. aquimaris* CH9 ซึ่งสามารถผลิตสารสีในกลุ่มแคโรทีนอยด์ และมีอัตราการสร้างสปอร์ที่สูง ในงานวิจัยของ Chen และคณะ (2016) ได้คัดแยกและจัดจำแนก *Bacillus* spp. จากดินตะกอนในบ่อเลี้ยงปลิงทะล สามารถคัดแยกและจำแนกได้เป็น *B. subtilis* G024 โดยแสดงคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้พบแบคทีเรียที่คาดว่าเป็นบาซิลลัส

จากแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ เช่นเดียวกับรายงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น โดยการคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส ยังมีรายงานพบในสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ดินตะกอนในทะเล (Pournejati et al., 2019) ดินตะกอนในบ่อเลี้ยงกุ้ง (Tepaamorndech et al., 2019) ดินบริเวณรากพืช (Zhu et al., 2020) น้ำทะเล (Hentati et al., 2016) ลำไส้กุ้ง (Navinchandran et al., 2014) ลำไส้ปลานิล (Kuebutornye et al., 2019) ลำไส้ฉลาม (Wu et al., 2018) ทางเดินอาหารไก่ (Luong et al., 2018) ทางเดินอาหารสุกร (Ma et al., 2015) มูลลูกสุกร (Gu et al., 2015) อุจจาระมนุษย์ (Croce et al., 2014) และบ่อน้ำพุร้อน (Shajahan et al., 2017) เป็นต้น

จากการทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสปอร์บนอาหาร DSM ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ พบประสิทธิภาพในการสร้างสปอร์ที่สูงจำนวน 6 ไอโซเลต คือ OYNH31 CPPES01T2 CKNJh11 SHPS1 HHPS5 และ THPS1 โดยมีประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ 82.09, 74.67, 80.33, 71.12, 79.78 และ 71.42 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาของ Nguyen และคณะ (2015) คัดแยกแบคทีเรียที่สร้างสปอร์จากระบบทางเดินอาหารของไก่ ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสและมีความสามารถในการสร้างสปอร์ได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ บนอาหาร DSM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสจะสร้างสปอร์เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยสปอร์สามารถทนต่อความแห้งแล้ง สีย้อม สารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อ รังสี และความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้ดี ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้เลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้างสปอร์ที่ดีมาทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก ได้แก่ ความไวต่อยาปฏิชีวนะ การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย การย่อยเม็ดเลือด การทนต่อความร้อนและแอลกอฮอล์ การทนต่อกรดในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดี และในงานวิจัยของ Luong และคณะ (2018) ได้คัดแยกแบคทีเรียที่สร้างสปอร์จากทางเดินอาหารของไก่ สามารถคัดแยกและจำแนกได้เป็น *B. aquimaris* CH9 ซึ่งสามารถผลิตสารสีในกลุ่มแคโรทีนอยด์ และมีอัตราการสร้างสปอร์ที่สูงเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ บนอาหาร DSM ดังนั้นแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสที่คัดแยกได้มีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ได้ เนื่องจากมีอัตราการผลิตสปอร์สูงและสามารถอยู่รอดระหว่างกระบวนการผลิตได้

จากการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 6 ชนิด คือ แอมพิซิลลิน เททราไซคลิน กานามัยซิน คลอแรมเฟนิคอล อะมอกซีซิลลิน และคลอกซาซิลลิน ของแบคทีเรีย 6 ไอโซเลต คือ OYNH31 CPPES01T2 CKNJh11 SHPS1 HHPS5 และ THPS1 พบว่า ไอโซเลต CPPES01T2 CKNJh11 และ HHPS5 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะทั้ง 6 ชนิดมากที่สุด ส่วนไอโซเลต OYNH31 SHPS1 และ THPS1 พบว่ามีความต้านทานต่อ แอมพิซิลลิน อะมอกซีซิลลิน และคลอกซาซิลลิน ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Manhar และคณะ (2015) ได้ทดสอบความไว และไม่ต้านต่อยาปฏิชีวนะของ *B. amyloliquefaciens* การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะบ่งชี้ว่า *B. amyloliquefaciens* มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ คือ คลอแรมเฟนิคอล เททราไซคลิน และสเตรปโตมัยซิน ยกเว้นเพนิซิลลิน

แอมพิซิลลิน และคลอกซาซิลลิน ซึ่งเป็นกลุ่มเพนิซิลลิน เป็นยาปฏิชีวนะที่มีโครงสร้างของบีตา-แลคแทม (Beta-lactum) ที่ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์แบคทีเรีย ทำให้แบคทีเรียมีผนังเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์ (Manhar et al., 2015) สายพันธุ์ของบาซิลลัสที่ต้านทานต่อบีตา-แลคแทม (Beta-lactum) อาจมีผลมาจากการซึมผ่านผนังเซลล์แบคทีเรียของยา หรือแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ Beta-lactamase มาทำลายโครงสร้างของบีตา-แลคแทม (Beta-lactum) และการกลายพันธุ์ทำให้เกิดการดัดแปลง PBPs (Penicillin Binding Protein) ของแบคทีเรีย (Nithya et al., 2012) Hoa และคณะ (2000) ยังรายงานถึงการดื้อต่อยาปฏิชีวะแอมพิซิลลิน และเพนิซิลลิน ของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสที่เป็นโพรไบโอติก

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของส่วนใสปราศจากเซลล์และเซลล์ของแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหาร LB จำนวน 6 ไอโซเลต คือ OYNH31 CPPES01T2 CKNJh11 SHPS1 HHPS5 และ THPS1 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าส่วนใสที่ปราศจากเซลล์และเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร LB ของไอโซเลต OYNH31 สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 มีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 9.33±0.16 และ 10.00±0.28 มิลลิเมตร ตามลำดับ และ CPPES01T2 ที่เลี้ยงในอาหาร LB สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ATCC 6633 และ *V. parahaemolyticus* มีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 9.36±0.15 และ 8.97±0.42 มิลลิเมตร ตามลำดับ และ THPS1 มีส่วนใสที่ปราศจากเซลล์สามารถยับยั้ง *V. parahaemolyticus* มีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 8.73±0.40 มิลลิเมตร และเซลล์เลี้ยงในอาหาร LB สามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 มีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 9.67±0.57 มิลลิเมตร ซึ่งมีรายงานการทดสอบความสามารถของส่วนใสปราศจากเซลล์ของ *B. coagulans* CGMCC 9951 ที่คัดแยกได้จากมูลลูกสุกรในปี 2015 โดย Gu และคณะ ได้ทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella enterica* supsp. *Enterica serovar enteritidis* ATCC 13076, *S. aureus* ATCC 29213, *Pastuerella multocida* ATCC 12947, *E. coli* O8, *Streptococcus suis* ATCC 43765 และ *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 พบว่า *B. coagulans* CGMCC 9951 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ได้ มีบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 28.3±3.4, 26.3±1.7, 23.5±2.8, 18.2±2.6, 15.6±1.3 และ 14.8±2.4 มิลลิเมตร ตามลำดับ และในปี 2020 Kim และคณะ ได้ทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียของ *B. subtilis* ที่คัดแยกได้จากลำไส้ของกุ้งแชบ๊วย ทดสอบยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp. และ *Micrococcus* sp. พบว่า *B. subtilis* ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ มีบริเวณยับยั้งเท่ากับ 12.0±2.0, 12.0±2.0, 21.0±3.0 และ 12.0±2.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีรายงานว่าแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัสสามารถผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ lipopeptide, surfactin (Santos et al., 2018), fengycin (Fan et al., 2017), iturin (Zhang et al., 2017), bacillomycin D (Tabbene et al., 2016) และ chitinase (Wang et al., 2018) โดยสามารถยับยั้ง

แบคทีเรียหรือเชื้อราชนิดอื่น นำไปสู่ประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้แก่ ด้านอุตสาหกรรม, การแพทย์และสิ่งแวดล้อม เป็นต้น

จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อความร้อนและแอลกอฮอล์ของไอโซเลต OYNH31 CPPES01T2 CKNJh11 SHPS1 HHPS5 และ THPS1 พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตสามารถทนต่อความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยมีอัตราการรอดชีวิต เท่ากับ 72.89±4.68, 80.98±0.59, 83.69±4.25, 76.83±2.19, 72.90±1.00 และ 75.56±1.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งอัตราการรอดชีวิตต่อการทนความร้อนแต่ละไอโซเลตไม่มีความกัน และแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต OYNH31 และ CPPES01T2 สามารถทนแอลกอฮอล์ได้ดีที่สุด มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 97.75±1.18 และ 99.02±0.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang และคณะ (2018) ที่ได้ทดสอบการทนความร้อนที่อุณหภูมิ 50-110 องศาเซลเซียสของแบคทีเรียบาซิลลัส ได้แก่ *B. licheniformis, B. subtilis, B. amyloliquefaciens* และ *B. velezensis* พบว่าสามารถทนต่อความร้อนที่ 50-110 องศาเซลเซียสได้นาน 10-30 นาที โดยที่มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 70-80 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสมีการสร้างสปอร์เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยสปอร์สามารถทนต่อความแห้งแล้ง และความร้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้ดี เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารหมัก ได้แก่ น้ำส้มสายชู และสุรา เป็นต้น งานวิจัยของ Luong และคณะ (2018) ได้คัดแยก *B. aquimaris* CH9 ที่สร้างสปอร์จากทางเดินอาหารของไก่ และมีอัตราการสร้างสปอร์ที่สูงเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ และสปอร์สามารถทนความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียสได้นาน 20 นาที โดยมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีแนวโน้มที่สามารถอยู่รอดได้ในกระบวนการผลิตเพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกในอาหารสัตว์ และจากงานวิจัยของ Permpoonpattana และคณะ (2012) ทดสอบความทนทานของสปอร์ *B. subtilis* PXN21 พบว่าสปอร์ที่ผสมในบิสกิตสามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 235 องศาเซลเซียส ได้นาน 8 นาที โดยจำนวนของสปอร์ลดลงเพียง 1 log CFU เท่านั้น และเสริม *B. subtilis* PXN21 ลงในหนูทดลอง พบว่าช่วยเสริมสร้างและกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าสปอร์ของบาซิลลัสนั้นสามารถอยู่รอดได้ในกระบวนการผลิตเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารของมนุษย์และสัตว์ได้ ในงานวิจัยของ Nerandzic และคณะ (2015) ทดสอบผลของแอลกอฮอล์ต่ออัตราการรอดชีวิตของ *B. thuringiensis* และ *B. subtilis* โดยทดสอบกับเอทานอลที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสปอร์ของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสโดยเฉพาะ *B. subtilis* มีความต้านทานต่อสารละลายเอทานอลหลังจากบ่มผ่านไปเป็นระยะเวลา 10 และ 60 นาที จำนวนสปอร์ของ *B. thuringiensis* และ *B. subtilis* ลดลง 1-2 log CFU เนื่องจากโครงสร้างของผนังสปอร์ทำให้เอทานอลไม่สามารถเข้าถึงแกนกลางของสปอร์ ทำให้สปอร์สามารถทนทานและไม่ถูกทำลายโดยแอลกอฮอล์

จากการทดสอบความเป็นแบคทีเรียก่อโรคเบื้องต้นของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส โดยการทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง พบว่าแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต คือ CPPES01T2 CKNJh11 และ THPS1 ที่ไม่สามารถย่อยเม็ดเลือดแดงได้ (γ-hemolysis) โดยจะไม่พบโซนใสรอบการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง Sheep blood ซึ่งจากรายงานวิจัยที่ผ่านมาของ Kuebutornye และคณะ (2019) ได้ทดสอบความสามารถในการย่อยเม็ดเลือดแดง เพื่อทดสอบความปลอดภัยของ *B. velezensis* TPS3, *B. subtilis* TPS4 และ *B. amyloliquefaciens* TPS17 ที่คัดแยกได้จากลำไส้ของปลานิล เพื่อนำแบคทีเรียไปประยุกต์ใช้เป็นโพรไบโอติกเสริมในสัตว์ พบว่า *B. velezensis* TPS3 และ *B. amyloliquefaciens* TPS17 มีการย่อยเม็ดเลือดในระดับ α-hemolysis คือย่อยเม็ดเลือดในระดับปานกลาง ส่วน *B. subtilis* TPS4 ไม่สามารถหลั่งเอ็นไซม์ฮีโมไลซินมาย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารที่ผสมกับเลือดแกะได้จึงคาดว่า *B. subtilis* TPS4 มีความปลอดภัยและสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นโพรไบโอติกในสัตว์ได้ และงานวิจัยของ Li และคณะใน (2019) ได้คัดแยกแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสที่เป็นโพรไบโอติกจากจามรี สามารถคัดแยก *B. subtilis* และ *B. velezensis* จากนั้นทดสอบความเป็นแบคทีเรียก่อโรคเบื้องต้น พบว่าไม่มีการย่อยเม็ดเลือดบนอาหารที่ผสมกับเลือดแกะ ซึ่งในงานวิจัยนี้ให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับรายงานวิจัยข้างต้น คือ มีแบคทีเรียที่ไม่สามารถหลั่งฮีโมไลซินมาย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ แสดงว่าแบคทีเรียอาจไม่ก่อโรคหรือมีโอกาสก่อโรคต่ำ จึงเลือกแบคทีเรียที่อาจไม่ก่อโรคมาทดสอบการทนต่อกรดในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดีต่อไป

จากการทดสอบการทนต่อกรดในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดีของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต คือ CKNJh11 CPPES01T2 และ THPS1 พบว่าไอโซเลต CKNJh11 และ THPS1 สามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ดีที่สุด ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.3 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์เกลือน้ำดี เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ไอโซเลต CKNJh11 มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 90.36±0.66, 87.32±0.41 และ 84.55±0.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไอโซเลต THPS1 มีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 89.68±0.59, 89.04±1.18 และ 77.33±0.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และทดสอบการทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลต สามารถทนต่อกรดได้ดีแม้ในสภาวะความเป็นกรดสูงถึง pH 2.0, 2.5 และ 3.0 ไอโซเลต CKNJh11 มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดเท่ากับ 82.60±1.16, 85.33±0.39 และ 89.34±0.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งถือว่ามีอัตราการรอดชีวิตที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยที่ผ่านมา โดย *B. amyloliquefaciens* AMS1 พบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 70.07 เปอร์เซ็นต์ในสารละลายเพปซินที่ pH 2.0 หลังจากการบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (Manhar et al., 2015) *B. subtilis* PRBS-1 พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายเพปซินที่ pH 2.0 และ 3.0 (Ritter et al., 2018) *B. coagulans* CGMCC 9951 มีอัตราการรอดชีวิตลดลงเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ ที่เกลือน้ำดี 0.9 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 4 ชั่วโมง และสามารถทนต่อ pH 2.0 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยอัตราการรอด

ชีวิตยังคงสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Gu et al., 2015) ในปี 2017 Lee และคณะ ได้ทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกที่ทนต่อกรดและสภาวะที่มีเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส พบว่าหลังจากได้รับสารละลายเพปซินความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (pH 2.0) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดถึง 99.31 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อได้รับสารละลายเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ หลังจาก 3 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุดถึง 90.31 เปอร์เซ็นต์ ความสามารถในการทนต่อสภาพแวดล้อมในกระเพาะอาหารที่เป็นกรดสูง และสภาพแวดล้อมของลำไส้ที่มีเกลือน้ำดีเป็นหนึ่งในคุณสมบัติสำคัญที่จำเป็นสำหรับแบคทีเรียโพรไบโอติก เพื่อให้สามารถเจริญในร่างกายของมนุษย์หรือสัตว์ได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้ให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับรายงานวิจัยข้างต้น จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลตที่เลือก คือ CKNJh11 CPPES01T2 และ THPS1 อาจมีความสามารถในการคงอยู่ได้หลังจากเข้าไปในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์

จากการทดสอบอัตราการรอดชีวิตของสปอร์เมื่อผสมในอาหารไก่ไข่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างกัน 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต คือ CKNJh11 CPPES01T2 และ THPS1 พบว่าปริมาณแบคทีเรียลดลงตลอดการทดลอง แต่อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียในอาหารไก่ไข่เมื่อผ่านไป 7 วัน ยังคงสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ในการเก็บที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส ดังนั้นการนำสปอร์แบคทีเรียไปใช้สามารถเตรียมสปอร์และเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 4-37 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ผ่านมาของ Nguyen และคณะ (2015) ได้นำสปอร์ของ *B. subtilis* CH16 มาผสมในอาหารไก่เพื่อเสริมเป็นโพรไบโอติกในอัตราส่วน 1 กิโลกรัมของโพรไบโอติกที่มีปริมาณสปอร์ 10^9 CFU/กรัม ต่อ 1 ตันของอาหาร และนำไปเข้ากระบวนการอัดเม็ดนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ พบว่าปริมาณแบคทีเรียลดลงแต่ยังมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการนำแบคทีเรียโพรไบโอติกที่สร้างสปอร์ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย เพื่อเป็นอาหารเสริมสำหรับสัตว์ปีกเนื่องจากสปอร์สามารถทนต่อความร้อนในระหว่างกระบวนการผลิตเม็ดอาหารสัตว์และการเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ ก่อนการนำอาหารที่เสริมสปอร์โพรไบโอติกไปใช้ในสัตว์

จากการสกัดดีเอ็นเอ และจำแนกแบคทีเรียไอโซเลต CKNJh11 ด้วยวิธีการตรวจสอบยีน *gyrA* โดยการใช้ไพรเมอร์ gyrAF และ gyrAR พบว่าดีเอ็นเอของแบคทีเรียมีขนาดมากกว่า 10 กิโลเบส (kb) และเมื่อใช้ดีเอ็นเอเป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยา PCR พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของแบคทีเรียมีขนาด 1000 คู่เบส (bp) ซึ่งในงานวิจัยของ Nguyen และคณะ (2015) ได้จัดจำแนก *B. subtilis* CH16 โดยการตรวจสอบยีน *gyrA* พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาด 1000 คู่เบส (bp) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และจัดลำดับวิวัฒนาการได้เป็น *B. subtilis* ในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้น เนื่องจากการจัดจำแนกโดยใช้ยีน *gyrA* เป็นการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของกลุ่ม *Bacillus sp.* โดยยีน *gyrA* ที่จะควบคุมการสร้าง DNA gyrase ในแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส

(Sabaté et al.,2013) ดังนั้นจึงสามารถคาดการณ์ได้ว่าไอโซเลต CKNJh11 อาจเป็นแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าไอโซเลต CKNJh11 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 16S rDNA คล้ายกับ *B. aryabhattai* B8W2 โดยมีความคล้ายคลึงกันถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tepaamorndech และคณะ (2019) ที่ได้คัดแยกแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสจากดินตะกอนในฟาร์มเลี้ยงกุ้งเพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้งขาว เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 16S rDNA พบว่าคล้ายกับ *B. aryabhattai* B8W2 และจึงถูกจำแนกเป็น *B. aryabhattai* TBRC8450 ดังนั้นจากผลการเปรียบเทียบคุณสมบัติโพรไบโอติกของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ จึงเลือกไอโซเลต CKNJh11 ซึ่งมีประสิทธิภาพการสร้างสปอร์สูงสุด มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ ไม่สามารถย่อยเม็ดเลือดได้ ความทนทานต่อกรดในกระเพาะอาหาร เกลือน้ำดี ความร้อน และมีอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ในอาหารไก่สูงสุดที่อุณภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส มาทดสอบในขั้นตอนต่อไปก่อนการทดลองในไก่ เพื่อนำไปทดสอบการห่อหุ้มสปอร์และจำแนกแบคทีเรียไอโซเลตระดับสปีชีส์โดยการตรวจสอบยีน วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดย 16S rDNA ต่อไป

จากการวัดประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์ การปลดปล่อยเซลล์ ขนาดของเม็ดเจล และทดสอบคุณสมบัติการรอดชีวิตของสปอร์ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนต นำสปอร์ CKNJh11 มาห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) นำไปอบแห้งและวัดขนาดของเม็ดเจล พบว่าขนาดของเม็ดเจลแบบเปียกและแบบแห้งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยตั้งแต่ 3.8-4.7 มิลลิเมตร ประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์สปอร์แบคทีเรียก่อนและหลังการทำให้แห้งด้วยความร้อนมีประสิทธิภาพการห่อหุ้มเซลล์เฉลี่ย 85.03 และ 87.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ วัดอัตราการปลดปล่อยเซลล์ออกจากเม็ดเจลก่อนและหลังการทำให้แห้งด้วยความร้อนมีอัตราการปลดปล่อยเซลล์เฉลี่ย 87.37 และ 89.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การทดสอบคุณสมบัติการทนต่อกรดในกระเพาะอาหารและเกลือน้ำดี อัตราการรอดชีวิตของสปอร์ที่ห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตทั้งก่อนและหลังการทำให้แห้งด้วยความร้อน พบว่าที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดี 0.1, 0.3 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เม็ดเจลแบบแห้งจะมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงที่สุดถึง 94 เปอร์เซ็นต์ และการทนต่อกรดในกระเพาะอาหารที่ค่า pH 2.0, 2.5 และ 3.0 เม็ดเจลแบบแห้งจะมีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์สูงที่สุดถึง 94 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการนำเม็ดแอลจิเนตไปอบแห้งด้วยความร้อน ทำให้ประสิทธิภาพของเม็ดแอลจิเนตเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ผ่านมาของ Vejan และคณะ (2018) ได้ห่อหุ้ม *B. salmalaya* 139SI โดยการเคลือบสองชั้นอย่างง่ายด้วยเทคนิคไบโอโพลีเมอร์ ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนข้าวกล้อง แอลจิเนต และไคโตซาน พบว่า *B. salmalaya* 139SI ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตและนำไปทำให้แห้ง พบประสิทธิภาพการห่อหุ้มที่สูง 89.3-99.7 เปอร์เซ็นต์ และการห่อหุ้มเซลล์ยังช่วยป้องกันแบคทีเรียต่อการทำให้แห้ง จากงานวิจัยของ Pandey และคณะ (2017) ที่ได้ห่อหุ้มสปอร์ของ *B. coagulans* ที่เป็นโพรไบโอติก เพื่อรักษาอัตราความมีชีวิตรอดใน

ระหว่างการเก็บ พบว่าการห่อหุ้มเซลล์และการทำแห้งแบบพ่นฝอยทำให้เซลล์ของ *B. coagulans* ประมาณ 60-80 เปอร์เซ็นต์ สามารถอยู่รอดได้เป็นระยะเวลาถึง 90 วัน จากงานวิจัยของ ชารัญกร และปาลิดา (2561) ที่ได้ห่อหุ้มสปอร์แบคทีเรียโพรไบโอติกด้วยโซเดียมแอลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ผ่านการห่อหุ้มเซลล์มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าเซลล์อิสระภายใต้สภาวะในระบบทางเดินอาหารจำลอง ในขณะที่อัตราการอยู่รอดของเซลล์ที่ไม่ผ่านการห่อหุ้มมีค่าลดลงร้อยละ 3.83 (0.36 log CFU/ml) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาเป็นเวลา 14 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติกด้วยสารที่เหมาะสมจะช่วยให้เซลล์สามารถรอดชีวิตในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาวะที่เป็นกรดเบสรุนแรงในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก ลดการสูญเสียความมีชีวิตในระหว่างการเก็บรักษา และการห่อหุ้มสปอร์ให้อยู่ในรูปของเม็ดเจลสามารถนำไปผสมกับอาหารสัตว์ได้ง่ายกว่าการเสริมสปอร์ในรูปแบบการป้อนให้กับสัตว์โดยตรง (Pradipta et al., 2019) ซึ่งในงานวิจัยนี้ให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับรายงานวิจัยข้างต้น คือ นำสปอร์ CKNJh11 มาห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตและผสมในอาหารไก่ ตรวจสอบความมีชีวิตของสปอร์โดยนำอาหารมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตของสปอร์สูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ในทุก ๆ อุณหภูมิของการเก็บ

ผลของการเสริมโพรไบโอติกในอาหารต่อสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพของไข่ของไก่สายพันธุ์ไฮไลน์บราวน์อายุ 23 สัปดาห์ ทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากผลการทดลอง พบว่าการเสริมโพรไบโอติกในอาหารแบบห่อหุ้มสปอร์ด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ระดับ 10^6 สปอร์ มีแนวโน้มทำให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตไข่และมวลไข่เพิ่มขึ้นในช่วงสัปดาห์ที่ 23-25 เป็นผลเนื่องมาจากช่วง 3 สัปดาห์แรกเป็นช่วงปรับตัวของไก่เมื่อเริ่มการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Upadhaya และคณะ (2019) พบว่าการเสริมโพรไบโอติก *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ในอาหารไก่ไข่สายพันธุ์ไฮไลน์บราวน์อายุ 12 สัปดาห์ เสริมในปริมาณ 8×10^6 CFU ทดลองเป็นเวลา 6 สัปดาห์ มีผลให้การผลิตไข่มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น แต่การเสริมโพรไบโอติกในอาหารที่ระดับต่าง ๆ ทั้งแบบสปอร์อิสระและสปอร์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตไม่มีผลต่อสมรรถภาพการผลิต ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว น้ำหนักไข่ ปริมาณอาหารที่กิน และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นผลผลิตไข่ ในด้านคุณภาพไข่การเสริมโพรไบโอติกในอาหารรูปแบบสปอร์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ระดับ 10^6 สปอร์ มีแนวโน้มทำให้น้ำหนักเปลือกไข่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการศึกษาของ Hosseindoust และคณะ (2017) พบว่าความแข็งแรงของเปลือกไข่แและความหนาของเปลือกไข่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเป็นผลมาจากการเสริม *B. subtilis* ในปริมาณ 10^8-10^9 CFU อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสสามารถผลิตเอนไซม์หรือกรดทำให้สามารถดูดซึมปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสไปใช้ในการสร้างเปลือกไข่ได้เพิ่มขึ้น (Abdelqader et al.,2013) Guo และคณะ (2016) พบว่าการเสริม *B. subtilis* CGMCC 1.921 ในอาหารของไก่ไข่ช่วยปรับปรุงความแข็งแรงของเปลือกไข่ให้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

ตั้งแต่ 8 สัปดาห์เป็นต้นไป งานวิจัยของ Tang และคณะ (2017) ศึกษาผลของการเสริม *B. amyloliquefaciens* ต่อสมรรถภาพการผลิตไข่ของไก่ไข่ โดยนำเชื้อในรูปแบบผงมาผสมกับอาหารในปริมาณ $1x10^7$ และ $1x10^8$ CFU ต่ออาหารไก่ 1 กิโลกรัม พบว่าในช่วง 4-6 สัปดาห์ของการเลี้ยงไก่ ผลผลิตไข่เพิ่มมากขึ้น ส่วนความแข็งแรงและความหนาของเปลือกไข่เพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 3 และ 6 สัปดาห์ ดังนั้นจากผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าการเสริมโพรไบโอติกในอาหารไก่ที่ปริมาณ 10^6-10^9 CFU เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการเพิ่มสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพไข่ในไก่ไข่

จากการเสริมโพรไบโอติกต่อจำนวนแบคทีเรีย *Salmonella* sp., *E. coli* และแบคทีเรียกรดแล็กติกในมูลไก่ พบว่าการเสริมโพรไบโอติกในอาหารที่ระดับต่าง ๆ ทั้งแบบสปอร์อิสระ และสปอร์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตมีผลทำให้จำนวนของ *Salmonella* sp. และ *E. coli* ในมูลไก่ลดลง และทำให้จำนวนของแบคทีเรียกรดแล็กติกในมูลไก่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการเสริมแบบสปอร์อิสระและสปอร์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ระดับ 10^6 และ 10^8 สปอร์ จะไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Yang และคณะ (2019) พบว่าการเสริมบาซิลลัสในอาหารไก่ไข่มีผลให้จำนวนของ *E. coli* ลดลง และจำนวนของ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ในลำไส้ใหญ่เพิ่มขึ้น Tang และคณะ (2017) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของ *B. amyloliquefaciens* โดยผสม 10^7 CFU ต่ออาหารไก่ไข่ 1 กิโลกรัม พบว่าในช่วง 4-6 สัปดาห์ ความแข็งแรงของเปลือกไข่ และความหนาของเปลือกไข่เพิ่มขึ้น จำนวนของ *Lactobacillus* ในลำไส้เพิ่มขึ้น ในขณะที่จำนวนของ *E. coli* และ *Salmonella* sp. ลดลง นอกจากนี้การปลดปล่อย NH_3 ในมูลยังลดลงอีกด้วย และงานวิจัยของ Yang และคณะ (2017) พบว่าจำนวนของ *E. coli* และ *Salmonella* ในไก่กลุ่มที่เสริม *B. licheniformis* และ *B. subtilis* มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนจำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้งหมดและ *Bifidobacterium* มากกว่ากลุ่มควบคุม ทั้งนี้เป็นเพราะ *B. licheniformis* และ *B. subtilis* มีความสามารถในการเกาะติดผนังลำไส้ได้ดีกว่า ทำให้เชื้อโรคอื่น ๆ เช่น *E. coli* และ *Salmonella* ไม่มีพื้นที่ในการเกาะติดและไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ และงานวิจัยของ Tepaamorndech และคณะ (2019) ได้คัดแยก *B. aryabhattai* TBRC8450 จากดินตะกอนในฟาร์มเลี้ยงกุ้งเพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว โดยผลจากการเสริมโพรไบโอติกในอาหาร พบว่าปริมาณ *Vibrio* spp. และแบคทีเรียก่อโรคลดลง เพิ่มแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหารของกุ้ง ซึ่งการใช้โพรไบโอติกเสริมในสัตว์สามารถลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรคได้โดยกลไกต่าง ๆ ได้แก่ การผลิตสารยับยั้ง การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของโฮสต์ และการแย่งพื้นที่ยึดเกาะในระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น ซึ่งจากการคัดแยกแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัสจากตัวอย่างสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน เนื่องจากสามารถคัดแยกบาซิลลัสได้จากสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย เพราะเป็นแบคทีเรียที่มีการแพร่กระจายโดยทั่วไปในธรรมชาติ เพื่อหาแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัสที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกดีที่สุดมาประยุกต์ใช้ จึงต้องการตัวอย่างจากหลายแหล่งที่แตกต่างกัน เนื่องมาจากไม่

สามารถระบุได้ว่าจะสามารถพบแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัสที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกที่ดีได้จากแหล่งใด จากการศึกษาที่ผ่านมาของ EFSA (2015) ที่ศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกของ *B. subtilis* PB6 ซึ่งคัดแยกได้จากดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ และนำมาใช้เป็นสารเสริมโพรไบโอติกในอาหารสำหรับไก่ไข่สายพันธุ์ไฮไลน์บราวน์ การทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้ในปริมาณตั้งแต่ 10^6 - 10^8 CFU ต่ออาหารไก่ 1 กิโลกรัม มีผลต่อการเพิ่มปริมาณผลผลิตไข่ และน้ำหนักไข่เฉลี่ย การศึกษาของ Sen และคณะ (2012) ที่คัดแยก *B. subtilis* LS 1-2 จากซอสถั่วเหลืองหมัก และนำมาใช้เป็นสารเสริมโพรไบโอติกในอาหารสำหรับไก่เนื้อ พบว่าการเสริมในปริมาณตั้งแต่ 10^7 – 10^9 CFU ทำให้ไก่เนื้อมีน้ำหนักตัวเพิ่มมากขึ้น อัตราการเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้น ช่วยลดจำนวนของ *Clostridium* และ Coliform ในลำไส้ นอกจากนี้ยังทำให้ความสูงของวิลลัสในลำไส้เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่า *B. subtilis* LS 1-2 สามารถใช้เป็นสารเสริมโพรไบโอติกที่กระตุ้นการเจริญเติบโตในไก่เนื้อและสามารถปรับปรุงความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้และสุขภาพของลำไส้ไก่เนื้อได้ จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นนี้เป็นการนำโพรไบโอติกกลุ่มบาซิลลัสที่ได้จากสิ่งแวดล้อม คือ ดิน และผลิตภัณฑ์อาหารหมัก มาใช้ในสัตว์ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสที่มีคุณสมบัติโพรไบโอติกถึงแม้ว่าจะได้มาจากคัดแยกจากแหล่งอื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับสัตว์ก็สามารถมีคุณสมบัติโพรไบโอติกที่ดีและนำมาประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ได้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ได้จากลำไส้ครัสเตเซียน ดินบ่อกุ้ง มูลไก่ และดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อน พบว่าไอโซเลต CKNJh11 ซึ่งคัดแยกได้จากดินบ่อกุ้ง มีคุณสมบัติโพรไบโอติกที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่น คือ มีประสิทธิภาพการสร้างสปอร์สูง มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ ไม่สามารถย่อยเม็ดเลือดได้ มีความทนทานต่อกรดในกระเพาะอาหาร เกลือน้ำดี ความร้อน และมีอัตราการรอดชีวิตของสปอร์สูงเมื่อผสมในอาหารไก่และเก็บที่อุณภูมิ 4, 25 และ 37 องศาเซลเซียส เมื่อนำสปอร์ของไอโซเลต CKNJh11 มาห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) พบว่ามีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มและอัตราการปลดปล่อยสูง และมีอัตราการรอดชีวิตของสปอร์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารได้สูงกว่าสปอร์อิสระ และจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 16S rDNA พบว่าไอโซเลต CKNJh11 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับ *Bacillus aryabhattai* B8W2 โดยมีความคล้ายคลึงกันถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเสริมเป็นโพรไบโอติกในอาหารไก่ไข่เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าการเสริมโพรไบโอติกในอาหารแบบห่อหุ้มสปอร์ด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ระดับ 10^6 สปอร์ ทำให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตไข่และมวลไข่เพิ่มขึ้นในช่วงสัปดาห์ที่ 23-25 ในด้านคุณภาพไข่การเสริมโพรไบโอติกในอาหารรูปแบบสปอร์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตที่ระดับ 10^6 สปอร์ มีแนวโน้มทำให้น้ำหนักเปลือกไข่เพิ่มขึ้น และการเสริมโพรไบโอติกในอาหารที่ระดับต่าง ๆ ทั้งแบบสปอร์อิสระและสปอร์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโซเดียมแอลจิเนตมีผลทำให้จำนวนของ *Salmonella* sp. และ *E. coli* ในมูลไก่ลดลง และทำให้จำนวนของแบคทีเรียกรดแล็กติกในมูลไก่เพิ่มขึ้น ดังนั้นผลการวิจัยครั้งนี้สามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่นำมาประยุกต์ใช้เป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารสัตว์ได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรเพิ่มการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกให้มากขึ้น ตัวอย่างเช่น คุณสมบัติในการเกาะติดผนังลำไส้ หรือทดสอบการผลิตเอนไซม์หรือโปรตีนชนิดต่าง ๆ

5.2.2 ควรเพิ่มระยะเวลาในการทดลองเสริมโพรไบโอติกในไก่ เพื่อให้เห็นผลในด้านคุณภาพไข่และสมรรถภาพการผลิตไข่ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

5.2.3 หลังการทดลองเสริมโพรไบโอติกในไก่ ควรเก็บผลของจำนวนจุลินทรีย์ในลำไส้เพื่อตรวจสอบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกมีผลต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่น ประสิทธิภาพการเกาะติดผนังลำไส้หรือมีผลต่อเยื่อบุผนังลำไส้ของไก่หรือไม่

5.2.4 การทดลองในไก่ควรจะมีกลุ่มของไก่ที่ได้รับการเสริมด้วยอาหารพื้นฐานที่ผสมกับเม็ดแอลจิเนตที่ไม่ได้ห่อหุ้มสปอร์อยู่ภายใน เพื่อเปรียบเทียบว่าโซเดียมแอลจิเนตปกติไม่มีผลต่อสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพไข่ของไก่ไข่

บรรณานุกรม

กาญจนา เรืองยศจันทนา. 2556. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากมูลสัตว์ เพื่อนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกสายพันธุ์ผสมและการประยุกต์ใช่ในไก่. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒ.

ชารัญกร พระคุ้มครอง และปาลิดา ตั้งอนุรัตน์. 2561. การห่อหุ้มเซลล์ด้วยแอลจิเนตต่อการรอดชีวิตของโพรไบโอติกในระหว่างการเก็บรักษาน้ำผลไม้ผสม และภายใต้สภาวะในระบบทางเดินอาหารจำลอง. *การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระหว่างสถาบัน ครั้งที่ 6* (หน้า 57-62). สมุทรปราการ: มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

ชนิกานต์ ขวัญเมือง และณิชารีย์ เจียรชัย. 2560. การคัดแยกบาซิลลัสจากดินในบ่อเลี้ยงกุ้ง เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกในอุตสาหกรรมเกษตร. โครงงานวิทยาศาสตร์. โรงเรียน มอ.วิทยา-นุสรณ์ สุราษฎร์ธานี.

ทศพร เพชรทองเกลี้ยง. 2558. การคัดแยกแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัสที่สร้างสปอร์และสารสีได้ในลำไส้ครัสเตเชียน. โครงงานนักศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เทพอนันต์ สมานวงศ์, นพวรรณ เรืองเดชบุญฤทธิ์, สุพัตรา เมืองฮาม และ สุรีย์พร เอี่ยมศรี. 2559. การรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ห่อหุ้มด้วยวิธีเอนแคปซูเลชันในโยเกิร์ตนมข้าวโพด โยเกิร์ตนมวัว และโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ. 2(1): 25-35.

ธวัชชัย โพธิ์เฮือง, เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล และกัลยา เจือจันทร์. 2547. ประสิทธิภาพของการใช้โพรไบโอติกในการเลี้ยงไก่. *วารสารสัตวแพทยศาสตร์.* 14(1): 52-61.

บุญศรี จงเสรีจิตต์. 2552. จุลชีววิทยาทางอาหาร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปกร, นครปฐม.

ปิยาภรณ์ สุภัคดำรงกุล. 2559. การตรวจวิเคราะห์ *Bacillus* cereus ในอาหารโดยเทคนิคพีซีอาร์. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ.* 2(1): 56-70.

ปิยวรรณ ไทยทอง. 2560. การจำแนกและคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัสจากลำไส้ครัสเตเชียน. โครงงานนักศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มังกร โรจน์ประภากร และ อุไรลักษณ์ พงษ์เกษ. 2556. การพัฒนาผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกสำหรับกุ้งด้วยการห่อหุ้มเซลล์. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สิรสา สุมงคล. 2556. การเพิ่มการรอดชีวิตของแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยวิธีการห่อหุ้มร่วมกับเส้นใยจากพืชหัว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอนเอ จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย. 2547. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

หทัยรัตน์ มุสิกสังข์. 2551. การคัดเลือกแบคทีเรียแล็กติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกในไก่และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของเชื้อโดยการห่อหุ้ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อรทัย แดงสวัสดิ์, ชัญญนันท์ นพสุวรรณ, เจษฎา รัตนวุฒิ และปฏิมา เพิ่มพูนพัฒนา. 2562. การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส จากลำไส้ไก่ไข่เพื่อใช้เป็นสารเสริมโพรไบโอติกในไก่ไข่: ผลต่อสมรรถภาพและคุณภาพไข่. *วารสารแก่นเกษตร*. 47(ฉบับพิเศษ 1): 397-404.

Abdelqader, A., A. Al-Fataftah and G. Das. 2013. Effects of dietary *Bacillus subtilis* and inulin supplementation on performance, eggshell quality, intestinal morphology and microflora composition of laying hens in the late phase of production. *Animal Feed Science and Technology*. 179(1-4): 103-111

Ayed, H. B., H. Maalej, N. Hmidet and M. Nasri. 2015. Isolation and biochemical characterisation of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*.3: 255-261.

Bami, M. K., M. Afsharmanesh, M. Salarmoini and H. Tavakoli. 2017. Effect of zinc oxide nanoparticles and *Bacillus coagulans* as probiotic on growth, histomorphology of intestine, and immune parameters in broiler chickens. *Comparative Clinical Pathology*. 27(2): 399-406.

Beleneva, I. A. 2008. Distribution and characteristics of *Bacillus* bacteria associated with hydrobionts and the waters of the peter the great bay, Sea of Japan. *Published in mikrobiologiya*. 77(4): 558-565.

Biavati B. and C. Santini. 2007. Alternative therapies to reduce enteric bacterial infections and improve the microbiological safety of pig and poultry production systems. *Handbook of Organic Food Safety and Quality.* 241-261.

Boottanun, P., C. Potisap, J. G. Hurdle and R. W. Sermswan, 2017. Secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil can kill *Burkholderia pseudomallei*. *AMB Express*. 7(1).

Chamberlain N. 2009. Endospore stain of *Bacillus subtilis*. *American Society for Microbiology.* (2): 9-13.

Chen, Y., Li, J., Xia, P., Zhu, W. and Mo, Z. 2016. The ability of marine *Bacillus* spp. isolated from fish gastrointestinal tract and culture pond sediment to inhibit growth of aquatic pathogenic bacteria. *Iranian Journal of Fisheries Sciences.* 15(2): 701-714

Croce, O., Hugon, P., Lagier, J.-C., Bibi, F., Robert, C., Azhar, E. I. and Fournier, P.-E. 2014. Genome sequence of *Bacillus* simplex strain P558, isolated from a human fecal sample. *Genome Announcements*. 2(6).

Cutting, S. M. 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*. 28(2): 214-220.

Diplock, AT, JL. Charleux, G. Crozier-Willi, FJ. Kok, C. Rice-Evans, M. Roberfroid, W. Stahl and J. Vina-Ribes. 1998. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British Journal of Nutrition*. 80(1): 77–112.

EFSA. 2015. Scientific opinion on the safety and efficacy of *Bacillus subtilis* PB6 (*Bacillus subtilis*) as a feed additive for laying hens and minor poultry species for laying. *EFSA Journa*. (13).

Fan, H., Ru, J., Zhang, Y., Wang, Q. and Li, Y. 2017. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. *Microbiological Research*. 199: 89–97.

Galarza-Seeber, R., J.D. Latorre, X. Hernandez-Velasco, A.D. Wolfenden, L.R. Bielke, A. Menconi and G. Tellez. 2015. Isolation screening and identification of *Bacillus* spp. as direct-fed microbial candidates for aflatoxin B1 biodegradation. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5(9): 702-706.

Gauthier and M. J. 1976. Morphological, physiological and biochemical characteristics of some violet-pigmented bacteria isolated from seawater. *Canadian Journal of Microbiology*. 22(2): 138-149.

Ghelardi, E., F. Celandroni, S. Salvetti, S. Gueye, A. Lupetti and S. Senesi. 2015. Survival and persistence of *Bacillus clausii* in the human gastrointestinal tract following oral administration as spore-based probiotic formulation. *Applied and Microbiology.* 119(2): 552-559.

Gobi, N., B. Vaseeharan, J. Chen, R. Rekha, S. Vijayakumar, M. Anjugam and A. Iswarya. (2018). Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Fish & Shellfish Immunology.* 74: 501-508.

Goodfellow, M., B. Austin and C.H. Dickinson. 1976. Numerical taxonomy of some yellow-pigmented bacteria isolated from plants. *Microbiology.* 97: 219-233.

Gu, S., L. Zhao, Y. Wu, S. Li, J. Sun, J. Huang and D. Li. 2015. Potential probiotic attributes of a new strain of *Bacillus coagulans* CGMCC 9951 isolated from healthy piglet feces. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 31(6): 851-863.

Guo, X., D. Li, W. Lu, X. Piao and X. Chen. 2006. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. *Antonie van Leeuwenhoek.* 90(2): 139-146.

Guo, J. R., Dong, X. F., Liu, S. ang Tong, J. M. 2016. Effects of long-term *Bacillus subtilis* CGMCC 1.921 supplementation on performance, egg quality, and fecal and cecal microbiota of laying hens. *Poultry Science.*

He, Y., Wu, Z., Tu, L., Han, Y., Zhang, G. and Li, C. 2015. Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of bentonite and alginate. *Applied Clay Science*. 109-110: 68–75.

Hentati, D., Chebbi, A., Loukil, S., Kchaou, S., Godon, J.-J., Sayadi, S. and Chamkha, M. 2016. Biodegradation of fluoranthene by a newly isolated strain of *Bacillus stratosphericus* from Mediterranean seawater of the Sfax fishing harbour, Tunisia. *Environmental Science and Pollution Research*. 23(15): 15088–15100.

Hoa, N.T., L. Baccigalupi, A. Huxham, A. Smertenko, P.H. Van and S. Ammendola. 2000. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. *Appl and Environ. Microbiol*. 66: 5241–5247.

Hong, H.A., L.H. Duc and S.M. Cutting. 2004. The use of bacteria spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology review*. 29: 813-835.

Hong, H.A., E.,To, S. Fakhry, L. Baccigalupi, E. Ricca and S. M Cutting. 2009. Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. *Elsevier Science*. 160: 375-379.

Hossain, M., M. Begum and I. Kim. 2016. Effect of *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* and *Lactobacillus acidophilus* endospores on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, relative organ weight, microbial shedding and excreta noxious gas emission in broilers. *Veterinární Medicína.* 60(2): 77-86.

Hosseindoust, A., Mohammadi, M., Yao, Z. P., Jung, M. and Kim, I. H. 2017. Dietary *Bacillus subtilis* B2A strain in laying hens challenged with *Salmonella gallinarum*: effects on egg production, egg quality, blood haptoglobin and targeted intestinal Salmonella shedding. *Journal of Applied Animal Research*. 46(1): 512–517.

Khaneja, R., L. Perez-Fons. Fakhry, S. Baccigalupi, L. Steiger, S. To, E. Sandmann, G., Dong, T. C. Ricca, E. Fraser, P. D. and S. M. Cutting. 2009. Carotenoids found in *Bacillus*. *Journal of Microbiology*. 1-14.

Kim, Y. O., Mahboob, S., Viayaraghavan, P., Biji, D., Al-Ghanim, K. A., Al-Misned, F. and Kim, H.-J. 2020. Growth promoting activity of *Penaeus indicus* by secondary metabolite producing probiotic bacterium *Bacillus subtilis* isolated from the shrimp gut. *Journal of King Saud University – Science*. 32(2): 1641–1646.

Kovacs, A., T. Hartskamp, M. V. Kuipers, O. P. and R. V. Kranenburg. 2010. Genetic tool development for a new host for biotechnology, the thermotolerant bacterium *Bacillus coagulans*. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(12): 4085-4088.

Krasaekoopt, W., B. Bhandari, and H. Deeth. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 14(8): 737-743.

Kuebutornye, F. K., Lu, Y., Abarike, E. D., Wang, Z., Li, Y. and Sakyi, M. E. 2019. In vitro assessment of the probiotic characteristics of three *Bacillus* species from the gut of nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*.

Lee, S., J. Lee, Y. Jin, Jeong, J. Chang, Y. H., Y. Lee, and M. Kim. 2017. Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce. *LWT - Food Science and Technology*. 79: 518-524.

Li, J., Q. Yang, L.H. Zhao, S.M. Zhang, Y.X. Wang and X.Y Zhao. 2009. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. *Journal of Zhejiang University Science B*. 10: 264-272.

Li, A. 2019. Isolation and identification of potential *Bacillus* probiotics from free ranging yaks of Tibetan Plateau, China. *Pakistan Veterinary Journal*. 39(03): 377–382.

Liu, Y., Q. Lai, C. Dong, F. Sun, L.G. WangLi and Z. Shao. 2013. Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. *PLoS ONE*. 8(11).

Losick, R. 1996. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis. Annual Reviews Inc.* 30: 297–341.

Luong, T. T., Huong, N. T., Ha, B. T. V., Huong, P. T. T., Anh, N. H., Huong, D. T. V. and Anh, N. T. V. 2018. Carotenoid producing *Bacillus aquimaris* found in chicken gastrointestinal tracts. *Vietnam Journal of Biotechnology*. 14(4): 761–768.

Luckey, T. D. 1972. Introduction to intestinal microecology. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 25: 1292-1294.

Ma, L., Yang, W., Meng, F., Ji, S., Xin, H. and Cao, B. 2015. Characterization of an acidic cellulase produced by *Bacillus subtilis* BY-4 isolated from gastrointestinal

tract of Tibetan pig. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 56: 67–72.

Mack D. R., S. S. Michail Wei, L. Macdougal and M. A. Hollingsworth. 1999. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *American Journal of Physiology-cell Physiology*. 39: 941-950.

Manhar, A. K., D. Saikia, Y. Bashir, R. Mech, K. Nath, D. Konwar, B. K. and M. Mandal. 2015. In vitro evaluation of celluloytic *Bacillus amyloliquefaciens* AMS1 isolated from traditional fermented soybean (Churpi) as an animal probiotic. *Research in Veterinary Science*. 99: 149-156.

Manhar, A. K., Y. Bashir, D. Saikia, D. Nath, K. Gupta, B. K. Konwar, R. Kumar, N.D. Namsa and Mandal, M. 2016. Cellulolytic potential of probiotic *Bacillus Subtilis* AMS6 isolated from traditional fermented soybean (Churpi) : An in-vitro study with regards to application as an animal feed additive. *Microbiological Research.* 186-187: 62-70.

Minh, H. N., A. Durand, P. Loison, J. Perrier-Cornet and P. Gervais. 2011. Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90(4): 1409-1417.

Mohammad, B. T., H. I. Daghistani, A. Jaouani, S. Abdel-Latif and C. Kennes. 2017. Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Jordanian hot springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* isolates as potential producers of thermostable enzymes. *Inter J of Microbiol*. 1-12.

Ngo, H., Nguyen, T., Nguyen, Q., Tran, A., Do, H., Nguyen, A. and Nguyen, A. 2016. Screening of pigmented *Bacillus aquimaris* SH6 from the intestinal tracts of shrimp to develop a novel feed supplement for shrimp. *Journal of Applied Microbiology*. 121(5): 1357–1372.

Navinchandran, M., P. Iyapparaj, S. Moovendhan, R. Ramasubburayan, S. Prakash, G. Immanuel and A. Palavesam. 2014. Influence of probiotic bacterium *Bacillus cereus* isolated from the gut of wild shrimp *Penaeus monodon* in

turn as a potent growth promoter and immune enhancer in *P. monodon*. *Fish and Shellfish Immunology*. 36(1); 38-45.

Nerandzic, M. M., V. C. Sunkesula, P. Setlow and C.J. Donskey. 2015. Unlocking the sporicidal potential of ethanol: induced sporicidal activity of ethanol against *Clostridium difficile* and *Bacillus* spores under altered physical and chemical conditions. *Plos One.* 10(7).

Nguyen, A., D. Nguyen, M. Tran, L. Nguyen, A. Nguyen and T. Phan. 2015. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* CH16 strain from chicken gastrointestinal tracts for use as a feed supplement to promote weight gain in broilers. *Letters in Applied Microbiology*. 60(6): 580-588

Nithya, V. and P. M. Halami. 2012. Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources. Ann of Microbiol. 63(1): 129-137.

Nour, I., F. Fattouh and H. El-Adawi. 2014. Chemically Defined Medium for Optimization of Proteolytic Activity of *Lactobacillus bulgaricus* 761N. International *Journal of Life Science and Medical Research.* 4(4): 46-56.

Pandey, K. R. and Vakil, B. V. 2017. Encapsulation of Probiotic *Bacillus coagulans* for Enhanced Shelf Life. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. 5(04): 57-65.

Pechenik, A.J. 2000. Biology of the invertebrate, 4th. Singapore: MC Graw-Hill Co - Singapore Companies.

Permpoonpattana, P., H. Hong, R. Khaneja, and S. Cutting. 2012. Evaluation of *Bacillus subtilis* strains as probiotics and their potential as a food ingredient. *Beneficial Microbes*. 3(2): 127-135.

Phoem, A., S. Chanthachum and S. Voravuthikunchai. 2015. Preparation of *Eleutherine Americana* - Alginate Complex Microcapsules and Application in *Bifidobacterium longum*. *Nutrients.* 7(2): 831-848.

Pournejati, R., Gust, R. and Karbalaei-Heidari, H. R. 2019. An aminoglycoside antibacterial substance, S-137-R, produced by newly isolated *Bacillus velezensis* strain RP137 from the Persian gulf. *Current Microbiology*. 76(9): 1028–1037.

Pradipta, M. S. I., Harimurti, S. and Widodo, W. 2019. Feed supplementation with encapsulated indigenous probiotic lactic acid bacteria increased broiler chicken performance. *ASEAN Journal on Science and Technology for Development*. 36(1): 29–34.

Ritter A. C., Ana P. F. C., Flávio F. V. and A. Brandelli. 2018. Characterization of *Bacillus subtilis* available as probiotics. *Journal of Microbiology Research.* 8(2): 23-32

Rossland E., T. Langsrud, P.E. Granum and T. Sorhaug. 2005. Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. *International Journal of Food Science and Technology.* 98(2): 193-200.

Sabaté, D. C. and Audisio, M. C. 2013. Inhibitory activity of surfactin, produced by different *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strains, against *Listeria monocytogenes* sensitive and bacteriocin-resistant strains. *Microbiological Research*. 168(3): 125–129.

Santos, E. A. 2015. Endospores, sporulation and germination. *Molecular Medical Microbiology (Second Edition).* (1): 163-178.

Santos, V. S. V., Silveira, E. and Pereira, B. B. 2018. Toxicity and applications of surfactin for health and environmental biotechnology. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 21(6-8): 382–399.

Sella, S. R., Vandenberghe, L. P. and Soccol, C. R. 2014. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research*. 169(12): 931–939.

Sen, S., Ingale, S., Kim, Y., Kim, J., Kim, K., Lohakare, J. and Chae, B. 2012. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. *Research in Veterinary Science*. 93(1): 264–268.

Shajahan, S., Moorthy, I. G., Sivakumar, N. and Selvakumar, G. 2017. Statistical modeling and optimization of cellulase production by *Bacillus licheniformis* NCIM 5556 isolated from the hot spring, Maharashtra, India. *Journal of King Saud University – Science*. 29(3): 302–310.

Smith, Theresa J. 2000. Squalene: potential chemopreventive agent. *Expert Opinion on Investigational Drugs.* 9(8): 1841–8.

Sobczak, A. and K. Kozłowski. 2015. The effect of a probiotic preparation containing *Bacillus subtilis* ATCC PTA-6737 on egg production and physiological parameters of laying hens. *Annals of Animal Science*. 15(3): 711-723

Sornplang, P. and S. Piyadeatsoontorn. 2016. Probiotic isolates from unconventional sources: a review. *Journal of Animal Science and Technology*. 58(1).

Tabbene, O., Azaiez, S., Grazia, A. D., Karkouch, I., Slimene, I. B., Elkahoui, S. and Mangoni, M. 2016. Bacillomycin D and its combination with amphotericin B: promising antifungal compounds with powerful antibiofilm activity and wound-healing potency. *Journal of Applied Microbiology*. 120(2): 289–300.

Tang, R. Y., Z. L. Wu, G. Z. Wang and W. C. Liu. 2017. The effect of *Bacillus amyloliquefaciens* on productive performance of laying hens. Italian *Journal of Animal Science*. 17(2): 436-441.

Tepaamorndech, S., Chantarasakha, K., Kingcha, Y., Chaiyapechara, S., Phromson, M., Sriariyanun, M. and Visessanguan, W. 2019. Effects of *Bacillus aryabhattai* TBRC8450 on vibriosis resistance and immune enhancement in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology. 86: 4–13.

Thwaite J. E. and Atkins H. S. 2012. *Bacillus*: Anthrax; food poisoning. *Medical Microbiology (Eighteenth Edition)*. 237-244.

Upadhaya, S. D., Rudeaux, F. and Kim, I. H. 2019. Efficacy of dietary *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* supplementation continuously in pullet and lay period on egg production, excreta microflora, and egg quality of Hyline-Brown birds. *Poultry Science*. 98(10): 4722–4728.

Vandenbergh P.A. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*. 12: 221-238.

Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T. and Ismail, S. 2018. Encapsulation of *Bacillus salmalaya* 139SI using double coating biopolymer technique. *Letters in Applied Microbiology*. 68(1): 56–63.

Wang, D., Li, A., Han, H., Liu, T. and Yang, Q. 2018. A potent chitinase from *Bacillus subtilis* for the efficient bioconversion of chitin-containing wastes. *International Journal of Biological Macromolecules*. (116): 863–868.

Wang, Y., Dong, Z., Song, D., Zhou, H., Wang, W., Miao, H. and Li, A. 2018. Effects of microencapsulated probiotics and prebiotics on growth performance, antioxidative abilities, immune functions, and caecal microflora in broiler chickens. *Food and Agricultural Immunology*. 29(1): 859–869.

Wang, Z., Li, P., Luo, L., Simpson, D. J. and Gänzle, M. G. 2018. Daqu Fermentation Selects for Heat-Resistant *Enterobacteriaceae* and Bacilli. *Applied and Environmental Microbiology*. 84(21).

Wu, J., Xu, G., Jin, Y., Sun, C., Zhou, L., Lin, G. and Liu, K. 2018. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. GFP-2 , a novel *Bacillus* strain with antimicrobial activities, from Whitespotted bamboo shark intestine. *AMB Express*. 8(1).

Yaneisy, G.H., T. Perez-Sanchez, B. Ramon, L. Jose, R. Balcazar Jacques, M.S. Nicoli Joao, R. Zoraya, F. Hector, N. Odalys, A. Nereyda and H. Nabil. 2016. Isolation characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. *Journal of Integrative Agriculture.* 108: 125-132.

Yang, J., K. Qian, D. Wu, W. Zhang, Y. Wu and Y. Xu. 2017. Effects of different proportions of two *Bacillus* sp. on the growth performance, small intestinal morphology, caecal microbiota and plasma biochemical profile of Chinese Huainan Partridge Shank chickens. Journal of Integrative Agriculture. 16(6): 1383-1392.

Yang, J., Zhan, K. and Zhang, M. 2019. Effects of the use of a combination of two *Bacillus* species on performance, egg quality, small intestinal mucosal morphology, and cecal microbiota profile in aging laying hens. Probiotics and Antimicrobial Proteins.

Zhang, Z., Ding, Z., Zhong, J., Zhou, J., Shu, D., Luo, D. and Tan, H. 2017. Improvement of iturin A production in *Bacillus subtilis* ZK0 by overexpression of the comA and sigA genes. Letters in Applied Microbiology. 64(6): 452–458.

Zhu, J., Tan, T., Shen, A., Yang, X., Yu, Y., Gao, C. and Zeng, L. 2020. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* IBFCBF-4 against *Fusarium* wilt of watermelon. *Journal of Plant Pathology*. 102(2): 433–441.

Zeng, C., R. Zhao, X. Wen, P. Yu, Z. Zeng, S. Deng and D. Gong. 2017. Screening and identification of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain for aqueous enzymatic extraction of medium-chain triglycerides. Food Control. 78: 24-32.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient Agar (NA)

Lab-Lemco powder	1.0	กรัม/ลิตร
Yeast extract	2.0	กรัม/ลิตร
Peptone	5.0	กรัม/ลิตร
Sodium chloride	5.0	กรัม/ลิตร
Agar	15.0	กรัม/ลิตร

pH 7.4 ± 0.2 25°C

วิธีการเตรียม ชั่งอาหารสำเร็จรูป NA 28.0 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

2. Nutrient Broth (NB)

Lab-Lemco powder	1.0	กรัม/ลิตร
Yeast extract	2.0	กรัม/ลิตร
Peptone	5.0	กรัม/ลิตร
Sodium chloride	5.0	กรัม/ลิตร

pH 7.4 ± 0.2 25°C

วิธีการเตรียม ชั่งอาหารสำเร็จรูป NB 13 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

3. DSM Medium (Difco - sporulation medium)

Bacto nutrient broth (Difco)	8 กรัม
10% (w/v) KCl	10 มิลลิลิตร
1.2% (w/v) $MgSo_4.7H_2O$	10 มิลลิลิตร
1 M NaOH	1.5 มิลลิลิตร (pH 7.6)

วิธีการเตรียม นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นรอให้อุณหภูมิลงถึง 50 องศาเซลเซียส และใส่สารละลายดังนี้

1M $Ca(NO_3)_2$	1 มิลลิลิตร
0.01M $MnCl_2$	1 มิลลิลิตร
1mM $FeSO_4$	1 มิลลิลิตร

4. LB broth (Luria Bertani broth)

Tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
NaCl	5 กรัม
Distilled water	1000 ลิตร

วิธีการเตรียม นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และสำหรับอาหารแข็ง (LB agar) จะมีการเติมวุ้น 15 กรัม

5. Mueller Hinton Agar (MHA, HIMEDIA)

Meat, infusion from 300g	2.00 กรัม/ลิตร
Casien acid hydrolysate	17.50 กรัม/ลิตร
Starch	1.50 กรัม/ลิตร
Agar	17.00 กรัม/ลิตร
Final pH (at 25 °C) 7.3±0.1	

วิธีการเตรียม ชั่งอาหารสำเร็จรูป MHA 38.0 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

6. Motility test medium (Becton Dickinson)

Beef extract	3.00 กรัม/ลิตร
Pancreatic digest of gelatin	10.00 กรัม/ลิตร
Sodium chloride	5.00 กรัม/ลิตร
Agar	4.00 กรัม/ลิตร
Final pH (at 25 °C) 7.3±0.2	

วิธีการเตรียม ชั่งอาหารสำเร็จรูป Motility test medium 22.0 กรัม เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1000 มิลลิลิตรคนให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

7. Tryptone Broth

Tryptone	10.00 กรัม/ลิตร
Sodium chloride	5.00 กรัม/ลิตร

วิธีการเตรียม ชั่งส่วนประกอบทั้งหมด เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

8. Starch agar

NA	28 กรัม/ลิตร
Soluble starch	2 กรัม/ลิตร

วิธีการเตรียม ชั่งส่วนประกอบทั้งหมด เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

9. ชุดทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical test)

1. ทดสอบการเคลื่อนที่

- Motility medium (Difco)

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหารสำเร็จรูป Motility medium 22 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เป็นเวลา 15 นาที

2. ทดสอบแคทาเลส

- Hydrogen peroxide (H_2O_2)
- น้ำกลั่น
- แผ่นสไลด์

3. ทดสอบออกซิเดส

- Kovac's oxidase reagent
- กระดาษกรอง

4. ทดสอบอินโดล

- Tryptone broth
- น้ำกลั่น
- Kovac's indole reagent

5. ทดสอบไฮโดรลิซิสของแป้ง

- Beef extract	2.0	กรัม/ลิตร
- Peptone	5.0	กรัม/ลิตร
- Starch soluble	2.0	กรัม/ลิตร
- Agar	15.0	กรัม/ลิตร

10. สูตรอาหารไก่ไข่

ตารางภาคผนวกที่ 1 สูตรอาหารและส่วนประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง

	สูตรอาหารไก่ไข่ Hyline - Brown
วัตถุดิบ	**100 kg**
ข้าวโพด	56.60
กากถั่วเหลือง	23.13
รำละเอียด	4.00
ปลาป่น	3.00
เปลือกหอย	8.44
ไดแคลเซียมฟอสเฟต	1.60
น้ำมันพืช	2.50
DL-Methionine	0.13
เกลือ	0.30
พรีมิกซ์	0.30

ภาคผนวก ข
การทดสอบทางชีวเคมี

ภาคผนวก ข

การทดสอบทางชีวเคมี

การย้อมสีแบบแกรม (Gram staining)

1. วิธีเตรียมสไลด์

1.1 นำห่วงถ่ายเชื้อ (Loop) เผาไฟจนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปแตะหยดลงบนแผนสไลด์ที่สะอาด

1.2 นำห่วงถ่ายเชื้อ (Loop) เผาไฟจนแดง ทิ้งให้เย็น แล้วนำไปแตะเชื้อตัวอย่าง

1.3 Smear เชื้อที่อยู่ในหยดน้ำให้กระจายออกเป็นบริเวณบาง ๆ

1.4 ปล่อยสไลด์ทิ้งไว้ในอากาศให้แห้ง (Air dry)

1.5 ทำให้แบคทีเรียติดแน่นบนสไลด์ โดยใช้ความร้อน (Heat fixed) คือ นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟอ่อน ๆ จากตะเกียงแอลกอฮอล์ ประมาณ 5-6 ครั้ง

1.6 ปล่อยให้สไลด์เย็นลงแล้วนำไปย้อมสีแบบแกรมต่อไป

2. วิธีการย้อมสี

1. หยดสี Crystal violet ลงบนแผนสไลด์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ

2. หยด Gram iodine ลงบนแผนสไลด์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ

3. ล้างแผนสไลด์ด้วย Acetone-alcohol (Decolorizer) ให้ Iodine ออกเหลือจาง ๆ แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น

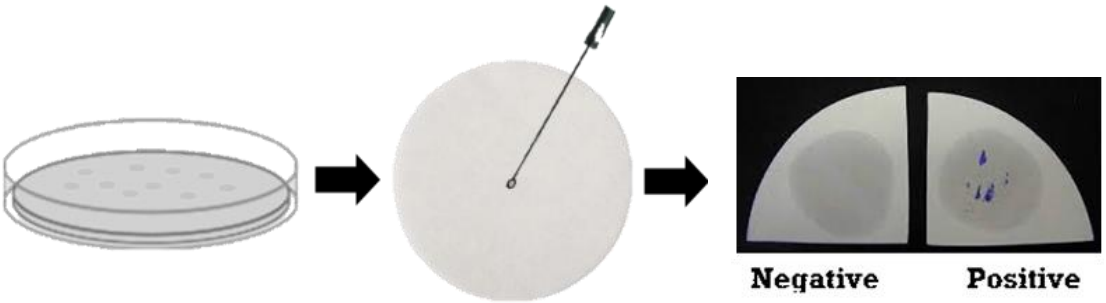
4. ย้อมทับด้วยสี Safranin O เป็นเวลา 30-60 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ ซับด้วยกระดาษทิชชูให้แห้ง

5. ตรวจดูด้วย Oil immersion lens ของกล้องจุลทรรศน์ แบคทีเรียที่เป็นแกรมบวก จะติดสีม่วง หรือสีน้ำเงินของ Crystal violet ส่วนแบคทีเรียที่เป็นแกรมลบ จะติดสีแดง หรือชมพูของ Safranin O

การทดสอบทางชีวเคมี

1. การทดสอบออกซิเดส

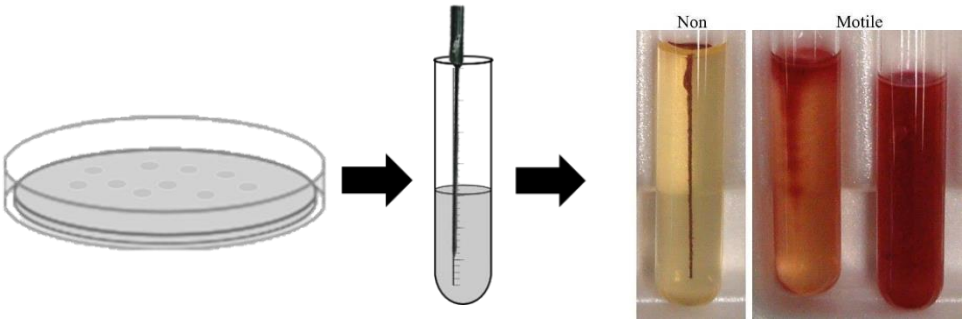
เลี้ยงเชื้อใน Nutrient agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาขีดบนกระดาษกรองที่หยด Kovac′s oxidase reagent โดยใช้ loop เขี่ยเชื้อ



ภาพภาคผนวกที่ 1 วิธีการทดสอบทางชีวเคมีของขั้นตอนการทดสอบออกซิเดส และการอ่านผลโดย ถ้าผลเป็นสีม่วงจะให้ผลเป็นบวก ถ้ามีสีน้ำตาลหรือสีอื่น ๆ จะให้ผลเป็นลบ โดยผลที่เป็นบวกจะต้องดูผลภายใน 10 วินาที

2. การทดสอบการเคลื่อนที่

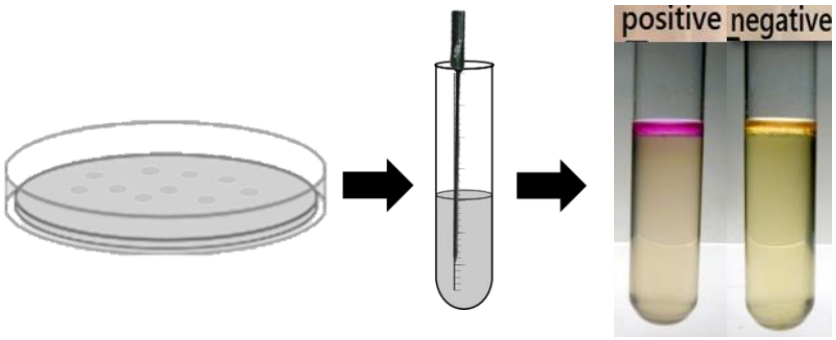
เลี้ยงเชื้อในอาหาร NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมา strap ลงบนอาหาร Motility บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง



ภาพภาคผนวกที่ 2 วิธีการทดสอบทางชีวเคมีของขั้นตอนการทดสอบเคลื่อนที่ และการอ่านผลโดย ถ้าเชื้อมีการเจริญโดยกระจายนอกรอยแทงของเชื้อจะให้ผลเป็นบวก ในทางตรงกันข้ามหากไม่มีการกระจายจะให้ผลเป็นลบ

3. การทดสอบอินโดล

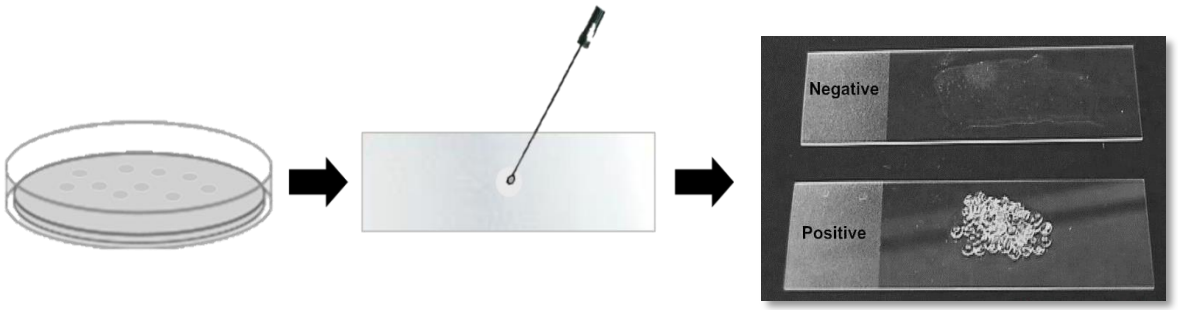
เลี้ยงเชื้อในอาหาร NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงหลัง จากนั้นนำมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว tryptone หยด Kovac′s reagent 4-5 หยด



ภาพภาคผนวกที่ 3 วิธีการทดสอบทางชีวเคมีของขั้นตอนการทดสอบอินโดล และการอ่านผลโดย ถ้าผลเป็นสีม่วงจะให้ผลเป็นบวก ถ้ามีสีน้ำตาลหรือสีอื่น ๆ จะให้ผลเป็นลบ

4. การทดสอบแคทาเลส

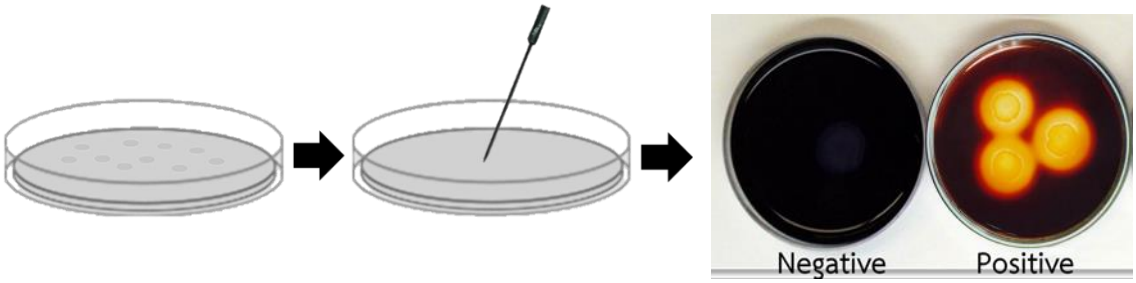
เลี้ยงเชื้อในอาหาร NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบ ลงบน slide แล้วหยด 3% H_2O_2 ลงบนเชื้อ 1 หยด



ภาพภาคผนวกที่ 4 วิธีการทดสอบทางชีวเคมีของขั้นตอนการทดสอบแคทาเลส และการอ่านผลโดย ถ้าผลมีฟองอากาศจะให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่มีสีฟองอากาศจะให้ผลเป็นลบ

5. การทดสอบไฮโดรลิซิสของแป้ง

เลี้ยงเชื้อในอาหาร NA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเลี้ยงเชื้อต่อในอาหาร starch agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หยดไอโอดีนจนท่วมอาหารเพื่อดูลักษณะการย่อยสลายแป้ง (วงใส)



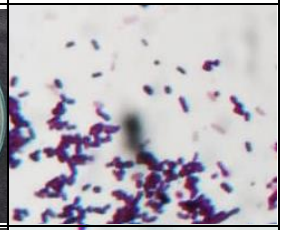
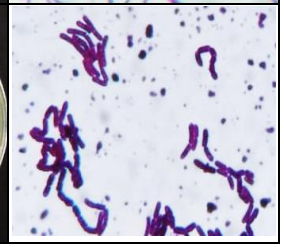
ภาพภาคผนวกที่ 5 วิธีการทดสอบทางชีวเคมีของขั้นตอนการทดสอบไฮโดรลิซิสของแป้ง และการอ่านผลโดย ถ้าผลมีวงใสจะให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่มีวงใสจะให้ผลเป็นลบ

ภาคผนวก ค
ข้อมูลรายละเอียดผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงผลจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกได้จากมูลไก่ และดินบ่อน้ำพุร้อน

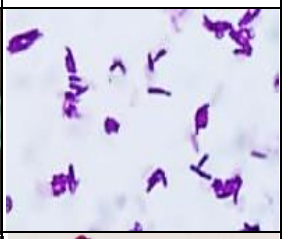
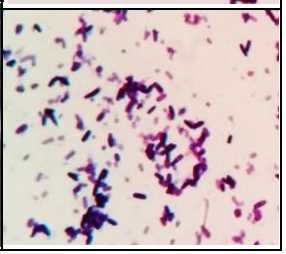
ตัวอย่าง	ซ้ำ	จำนวนโคโลนี (CFU/g)	
		จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด	จำนวนแบคทีเรียที่ทนร้อน
มูลไก่	Sample 1	2.19×10^{9}	2.67×10^{6}
	Sample 2	1.03×10^{9}	5.57×10^{5}
	Sample 3	1.03×10^{7}	4.90×10^{6}
	Sample 4	2.79×10^{9}	4.40×10^{7}
	Sample 5	1.47×10^{9}	1.39×10^{8}
Hot spring soil	Sample 1	7.50×10^{7}	7.50×10^{6}
	Sample 2	2.15×10^{9}	6.40×10^{6}
	Sample 3	2.30×10^{8}	5.90×10^{7}

ตารางภาคผนวกที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียไอโซเลต

แหล่งตัวอย่าง	ไอโซเลต	รูปร่างเซลล์	สีโคโลนี	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ลำไส้ครัสเตเชียน	CPPES01T2	แท่งสั้น	ส้ม	+	+		
	CSSES08H2	แท่งยาว	ชมพูอ่อน	+	+		
ดินบ่อกุ้ง	CKNJh11	แท่งยาว	เหลือง	+	+		

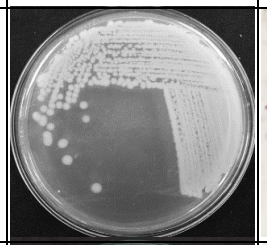
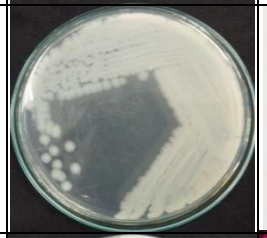
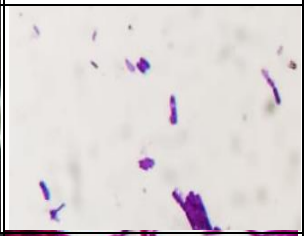
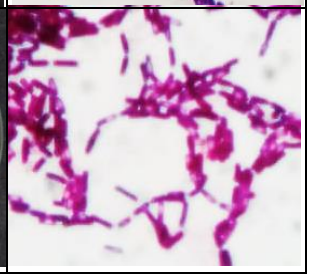
หมายเหตุ : + ในช่องการติดสีแกรม คือ แบคทีเรียแกรมบวก, + และ- ในช่องการสร้างสปอร์ คือ แบคทีเรียที่สร้างและไม่สร้างสปอร์

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียไอโซเลต

แหล่งตัวอย่าง	ไอโซเลต	รูปร่างเซลล์	สีโคโลนี	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ดินบ่อกุ้ง	CKNJh19	แท่งสั้น	ส้ม	+	+		
มูลไก่	OYNH13	แท่งสั้น	ขาวครีม	+	+		
	OYNH19	แท่งสั้น	เหลืองครีม	+	+		

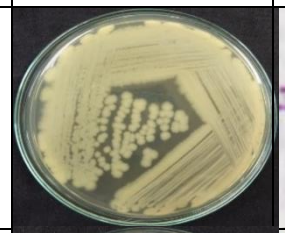
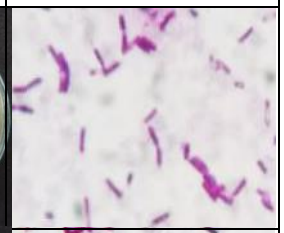
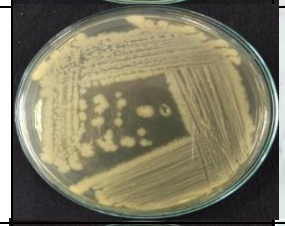
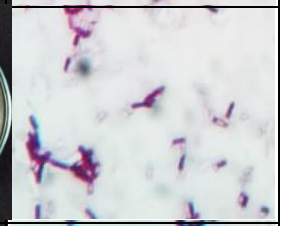
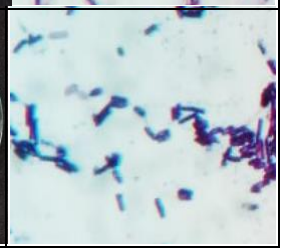
หมายเหตุ : + ในช่องการติดสีแกรม คือ แบคทีเรียแกรมบวก, + และ- ในช่องการสร้างสปอร์ คือ แบคทีเรียที่สร้างและไม่สร้างสปอร์

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียไอโซเลต

แหล่งตัวอย่าง	ไอโซเลต	รูปร่างเซลล์	สีโคโลนี	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
มูลไก่	OYNH21	แท่งสั้น	ขาวครีม	+	+		
	OYNH31	แท่งสั้น	ขาวครีม	+	+		
ดินบ่อน้ำพุร้อน	SHPS1	แท่งสั้น	ขาวครีม	+	+		

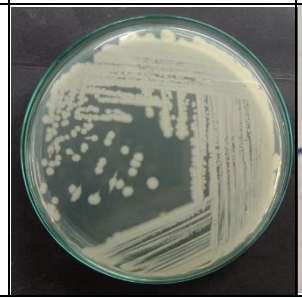
หมายเหตุ : + ในช่องการติดสีแกรม คือ แบคทีเรียแกรมบวก, + และ- ในช่องการสร้างสปอร์ คือ แบคทีเรียที่สร้างและไม่สร้างสปอร์

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียไอโซเลต

แหล่งตัวอย่าง	ไอโซเลต	รูปร่างเซลล์	สีโคโลนี	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ดินบ่อน้ำพุร้อน	SHPS2	แท่งสั้น	ขาวครีม	+	+		
	SHPS4	แท่งสั้น	ขาวครีม	+	+		
	HHPS5	แท่งสั้น	ขาวครีม	+	+		

หมายเหตุ : + ในช่องการติดสีแกรม คือ แบคทีเรียแกรมบวก, + และ- ในช่องการสร้างสปอร์ คือ แบคทีเรียที่สร้างและไม่สร้างสปอร์

ตารางภาคผนวกที่ 3 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียไอโซเลต

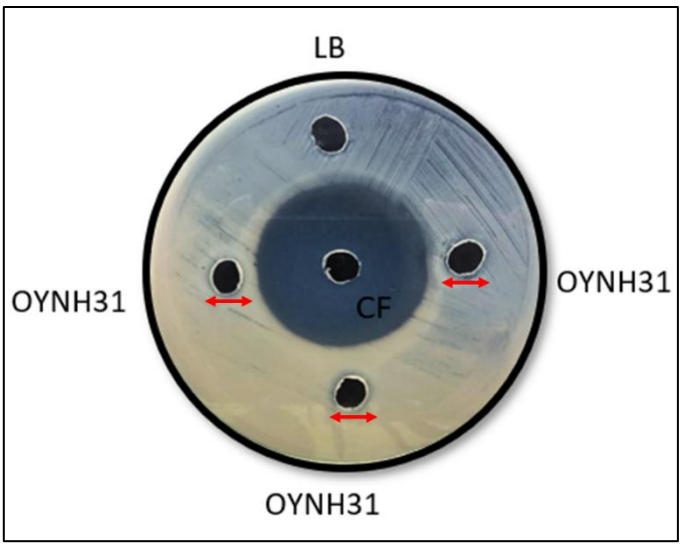
แหล่งตัวอย่าง	ไอโซเลต	รูปร่างเซลล์	สีโคโลนี	การติดสีแกรม	การสร้างสปอร์	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ดินบ่อน้ำพุร้อน	THPS1	แท่งยาว	ขาวครีม	+	+		

หมายเหตุ : + ในช่องการติดสีแกรม คือ แบคทีเรียแกรมบวก, + และ- ในช่องการสร้างสปอร์ คือ แบคทีเรียที่สร้างและไม่สร้างสปอร์

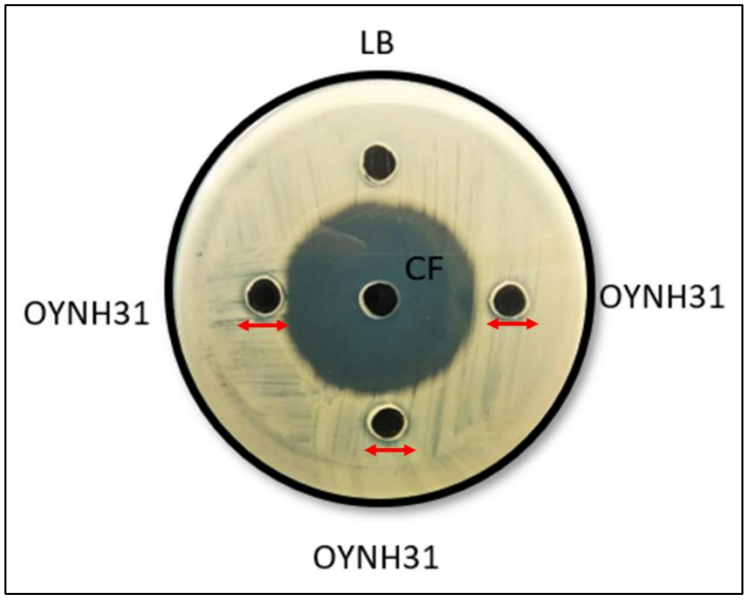
ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียไอโซเลต

แผ่นดิสก์ยาปฏิชีวนะ	ความไวต่อยาปฏิชีวนะ						
	B. subtilis ATCC 6633	OYNH31	CPPES01T2	CKNJh11	SHPS1	HHPS5	THPS1
แอมพิซิลลิน (10 µg/disc)	M	R	S	M	R	M	R
กานามัยซิน (30 µg/disc)	S	M	M	S	M	M	M
เททราไซคลิน (30 µg/disc)	S	S	S	S	M	S	M
คลอแรมเฟนิคอล (30 µg/disc)	S	M	S	S	S	S	M
อะมอกซีซิลลิน (30 µg/disc)	S	R	S	M	R	M	R
คลอกซาซิลลิน (1 µg/disc)	S	R	S	S	R	S	R

หมายเหตุ : S หมายถึง มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ (เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง ≥ 20 มิลลิเมตร)
M หมายถึง มีความไวต่อยาปฏิชีวนะปานกลาง (เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง 12-19 มิลลิเมตร)
R หมายถึง มีความต้านต่อยาปฏิชีวนะ (เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง ≤ 11 มิลลิเมตร)



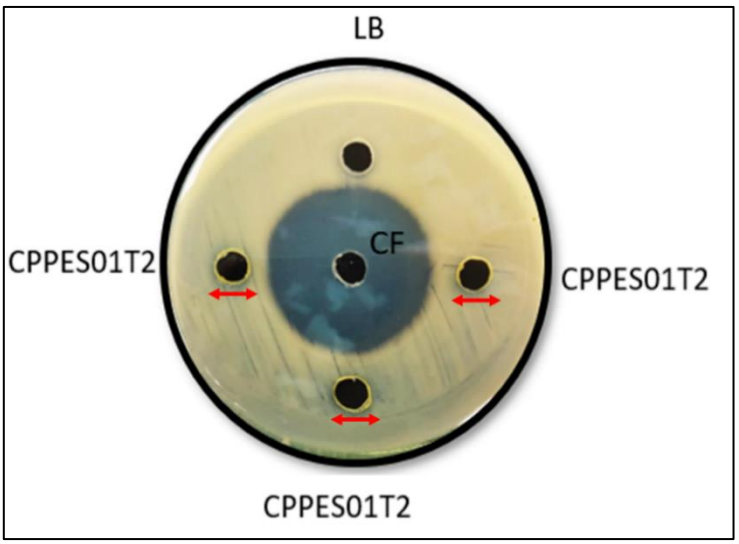
ภาพภาคผนวกที่ 6 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ATCC 6633 โดยใช้ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต OYNH31
CF คือ ยาปฏิชีวนะไซโปรฟลอกซาซิน ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
LB คือ อาหารเหลว Luria Bertani broth



ภาพภาคผนวกที่ 7 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ATCC 6633 โดยใช้เซลล์แบคทีเรียไอโซเลต OYNH31

CF คือ ยาปฏิชีวนะไซโปรฟลอกซาซิน ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

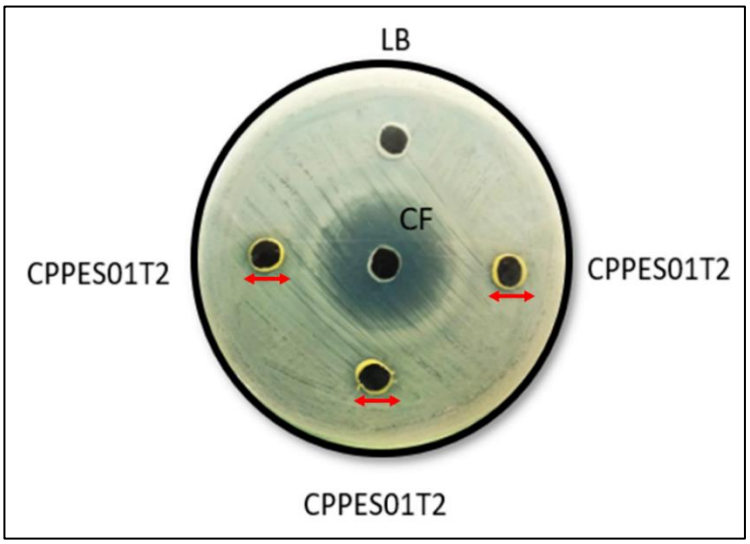
LB คือ อาหารเหลว Luria Bertani broth



ภาพภาคผนวกที่ 8 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ATCC 6633 โดยใช้เซลล์แบคทีเรียไอโซเลต CPPES01T2

CF คือ ยาปฏิชีวนะไซโปรฟลอกซาซิน ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

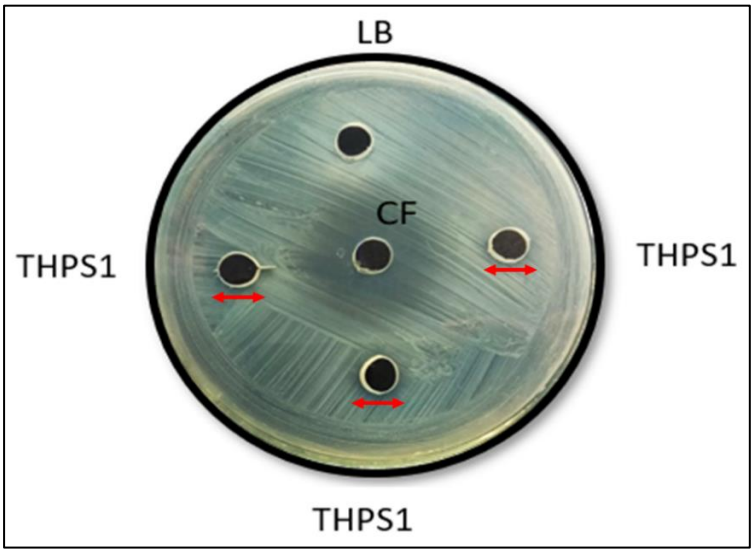
LB คือ อาหารเหลว Luria Bertani broth



ภาพภาคผนวกที่ 9 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* โดยใช้เซลล์แบคทีเรียไอโซเลต CPPES01T2

CF คือ ยาปฏิชีวนะไซโปรฟลอกซาซิน ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

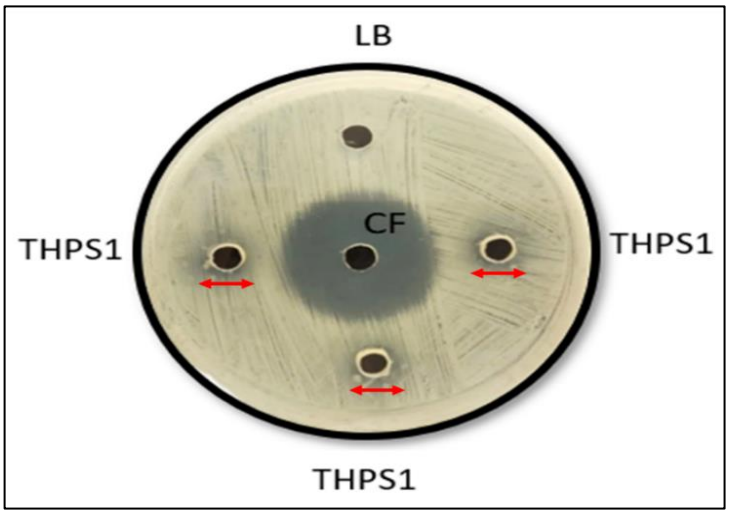
LB คือ อาหารเหลว Luria Bertani broth



ภาพภาคผนวกที่ 10 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ATCC 25923 โดยใช้เซลล์แบคทีเรียไอโซเลต THPS1

CF คือ ยาปฏิชีวนะไซโปรฟลอกซาซิน ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

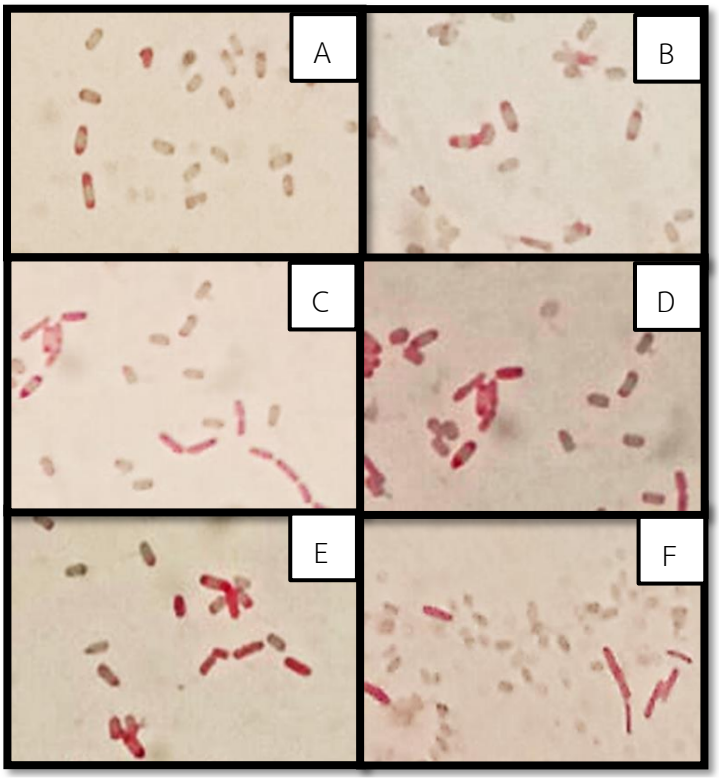
LB คือ อาหารเหลว Luria Bertani broth



ภาพภาคผนวกที่ 11 ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* โดยใช้ใช้ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรียไอโซเลต THPS1

CF คือ ยาปฏิชีวนะไซโปรฟลอกซาซิน ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

LB คือ อาหารเหลว Luria Bertani broth



ภาพภาคผนวกที่ 12 การสร้างสปอร์ของแบคทีเรียบนอาหาร DSM

A คือ สปอร์ของแบคทีเรีย OYNH31, B คือ สปอร์ของแบคทีเรีย CPPES01T2

C คือ สปอร์ของแบคทีเรีย CKNJh11, D คือ สปอร์ของแบคทีเรีย SHPS1

E คือ สปอร์ของแบคทีเรีย HHPS5, F คือ สปอร์ของแบคทีเรีย THPS1

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการเสริมโพรไบโอติกกลุ่มบาซิลลัสต่อสมรรถภาพการผลิตไข่และคุณภาพไข่ (สัปดาห์ที่ 1)

Parameters	Control (0 spore)	Free spore $1x10^6$ Spores	Free spore $1x10^8$ Spores	Alginate $1x10^6$ Spores	Alginate $1x10^8$ Spores	Sig.
Egg weight (g)	51.24±5.92	51.06±2.42	47.51±3.30	52.33±2.20	51.20±3.53	0.056
Eggshell strength (kg/cm^2)	4.13±1.08	4.58±0.57	4.49±1.01	4.50±0.44	4.68±0.97	0.752
Eggshell thickness (mm)	0.38±0.06	0.40±0.05	0.38±0.04	0.39±0.02	0.41±0.54	0.596
Eggshell weight (g)	5.80±0.63^{ab}	5.98±0.19^{a}	5.51±0.39^{b}	6.00±0.42^{a}	6.22±0.52^{a}	0.030
Yolk weight (g)	11.15±1.06	11.00±0.38	10.51±0.85	11.6±0.91	11.00±1.14	0.123
Yolk color score	7.46±0.78	7.32±1.01	7.33±0.79	6.98±0.74	7.72±0.89	0.532
Haugh unit	94.58±6.27	91.00±14.86	93.98±7.24	97.26±3.17	96.35±7.93	0.609
Egg production (%)	64.29±9.76	74.29±16.18	80.00±11.55	77.14±17.04	60.00±10.88	0.085
Feed intake (g/d)	67.47±11.28	62.53±14.43	65.81±20.49	56.62±13.88	67.63±10.88	0.521
FCR	2.04±0.34^{ab}	1.65±0.38^{b}	1.73±0.54^{b}	1.43±0.34^{b}	2.23±0.35^{a}	0.002

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน ของคุณภาพไข่ไก่, ตัวอักษร a และ b ที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 6 ผลการเสริมโพรไบโอติกกลุ่มบาซิลลัสต่อสมรรถภาพการผลิตไข่และคุณภาพไข่ (สัปดาห์ที่ 2)

Parameters	Control (0 spore)	Free spore $1x10^6$ Spores	Free spore $1x10^8$ Spores	Alginate $1x10^6$ Spores	Alginate $1x10^8$ Spores	Sig.
Egg weight (g)	52.62±5.62	53.66±3.99	50.05±2.93	55.08±4.04	52.76±4.37	0.126
Eggshell strength (kg/cm^2)	4.47±0.87	4.49±0.48	4.51±0.93	4.11±0.76	4.09±0.99	0.457
Eggshell thickness (mm)	0.35±0.03	0.33±0.13	0.36±0.03	0.38±0.04	0.34±0.04	0.682
Eggshell weight (g)	6.02±0.82	6.06±0.37	5.69±0.39	5.87±0.53	5.80±0.85	0.672
Yolk weight (g)	11.77±1.49	11.71±1.04	10.90±0.69	12.43±0.96	11.73±1.39	0.072
Yolk color score	7.70±0.95	7.53±0.69	7.99±1.03	7.37±0.81	7.76±0.81	0.596
Haugh unit	89.78±12.40	81.29±17.74	86.79±12.09	88.57±11.82	81.57±14.34	0.589
Egg production (%)	71.43±10.69	70.00±6.32	78.57±10.69	82.86±9.51	67.50±9.57	0.054
Feed intake (g/d)	66.09±18.94	59.92±19.88	69.30±16.48	56.98±8.35	68.85±18.18	0.488
FCR	$1.75±0.37^a$	$1.59±0.52^{ab}$	$1.76±0.42^a$	$1.24±0.18^b$	$1.93±0.51^a$	0.023

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน ของคุณภาพไข่ไก่, ตัวอักษร a และ b ที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 7 ผลการเสริมโพรไบโอติกกลุ่มบาซิลลัสต่อสมรรถภาพการผลิตไข่และคุณภาพไข่ (สัปดาห์ที่ 3)

Parameters	Control (0 spore)	Free spore $1x10^6$ Spores	Free spore $1x10^8$ Spores	Alginate $1x10^6$ Spores	Alginate $1x10^8$ Spores	Sig.
Egg weight (g)	53.79±4.17	53.93±3.97	51.23±2.34	55.27±2.71	53.20±3.39	0.179
Eggshell strength (kg/cm^2)	4.52±0.91	4.74±0.64	4.23±1.03	4.25±1.26	4.37±0.70	0.742
Eggshell thickness (mm)	0.37±0.03	0.37±0.03	0.36±0.02	0.35±0.03	0.37±0.03	0.674
Eggshell weight (g)	6.49±0.49	6.28±0.45	5.90±0.41	5.96±0.62	6.13±0.59	0.101
Yolk weight (g)	12.02±1.19	11.84±0.66	11.40±0.57	12.21±0.99	11.73±0.84	0.373
Yolk color score	8.11±0.61	8.06±1.44	7.78±0.79	7.24±0.84	8.11±0.49	0.223
Haugh unit	93.73±12.15	93.58±11.29	76.56±16.99	90.48±13.10	80.06±17.52	0.053
Egg production (%)	72.86±13.80	71.43±12.14	72.86±11.13	81.43±10.69	68.00±8.37	0.344
Feed intake (g/d)	54.57±9.98	38.62±8.47	54.61±14.89	44.48±14.97	45.07±8.41	0.122
FCR	$1.39±0.26^a$	$1.00±0.22^b$	$1.46±0.40^a$	$0.99±0.33^b$	$1.24±0.23^{ab}$	0.033

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน ของคุณภาพไข่ไก่, ตัวอักษร a และ b ที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 8 ผลการเสริมโพรไบโอติกกลุ่มบาซิลลัสต่อสมรรถภาพการผลิตไข่และคุณภาพไข่ (สัปดาห์ที่ 4)

Parameters	Control (0 spore)	Free spore $1x10^6$ Spores	Free spore $1x10^8$ Spores	Alginate $1x10^6$ Spores	Alginate $1x10^8$ Spores	Sig.
Egg weight (g)	54.46±3.15	53.39±3.17	53.48±8.24	52.89±3.41	53.97±4.18	0.968
Eggshell strength (kg/cm^2)	4.20±0.83	4.74±0.62	4.35±0.79	4.37±0.57	4.49±0.85	0.679
Eggshell thickness (mm)	0.37±0.02	0.38±0.02	0.35±0.03	0.37±0.03	0.36±0.03	0.213
Eggshell weight (g)	6.18±0.51	6.34±0.46	6.00±0.62	5.96±0.13	6.00±0.71	0.563
Yolk weight (g)	12.06±0.92	12.26±0.85	11.55±0.69	12.04±1.44	12.11±0.78	0.597
Yolk color score	8.28±0.81	8.07±0.72	8.82±0.89	7.87±0.86	8.48±0.56	0.106
Haugh unit	87.88±17.28	71.67±11.69	84.00±20.89	82.12±24.45	87.00±19.17	0.636
Egg production (%)	78.57±12.15	67.14±16.04	71.43±8.99	77.14±9.51	75.71±9.76	0.357
Feed intake (g/d)	$44.67±10.94^b$	$45.35±14.19^b$	$69.97±24.76^a$	$36.38±8.79^b$	$41.99±10.89^b$	0.006
FCR	$1.04±0.26^b$	$1.18±0.37^a$	$1.83±0.65^b$	$0.89±0.21^b$	$1.03±0.26^b$	0.002

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน ของคุณภาพไข่ไก่, ตัวอักษร a และ b ที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 9 ผลการเสริมโพรไบโอติกกลุ่มบาซิลลัสต่อสมรรถภาพการผลิตไข่และคุณภาพไข่ (สัปดาห์ที่ 5)

Parameters	Control (0 spore)	Free spore $1x10^6$ Spores	Free spore $1x10^8$ Spores	Alginate $1x10^6$ Spores	Alginate $1x10^8$ Spores	Sig.
Egg weight (g)	53.90±3.63	55.30±2.18	51.71±2.17	53.50±3.39	52.97±4.48	0.318
Eggshell strength (kg/cm^2)	4.53±0.88	4.59±0.59	4.26±0.53	4.29±0.68	4.36±0.61	0.824
Eggshell thickness (mm)	0.36±0.03	0.36±0.02	0.34±0.03	0.33±0.05	0.36±0.02	0.310
Eggshell weight (g)	5.70±0.49^b	6.38±0.54^a	6.36±0.45^a	5.86±0.39^{ab}	6.12±0.53^{ab}	0.031
Yolk weight (g)	12.14±1.16	12.48±0.71	11.91±0.49	12.09±0.70	11.86±1.05	0.639
Yolk color score	7.96±0.73	7.66±1.02	8.39±0.88	7.70±0.51	8.40±1.01	0.246
Haugh unit	97.52±3.79	88.51±15.31	95.74±6.39	87.07±12.16	92.43±10.67	0.220
Egg production (%)	70.00±20.00	62.00±10.95	71.67±13.29	70.00±8.16	75.71±11.34	0.555
Feed intake (g/d)	45.10±8.53	44.55±12.00	63.28±27.33	47.73±19.96	48.81±14.24	0.287
FCR	1.19±0.23	1.29±0.34	1.70±0.73	1.27±0.53	1.22±0.31	0.293

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน ของคุณภาพไข่ไก่, ตัวอักษร a และ b ที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 10 ผลการเสริมโพรไบโอติกกลุ่มบาซิลลัสต่อสมรรถภาพการผลิตไข่และคุณภาพไข่ (สัปดาห์ที่ 6)

Parameters	Control (0 spore)	Free spore $1x10^6$ Spores	Free spore $1x10^8$ Spores	Alginate $1x10^6$ Spores	Alginate $1x10^8$ Spores	Sig.
Egg weight (g)	54.28±3.80	54.40±5.56	50.83±2.67	53.48±4.32	53.24±3.82	0.372
Eggshell strength (kg/cm^2)	4.29±0.97	3.80±1.35	3.92±1.00	4.17±0.62	4.46±0.75	0.664
Eggshell thickness (mm)	0.35±0.04	0.34±0.05	0.32±0.04	0.36±0.02	0.36±0.01	0.173
Eggshell weight (g)	5.52±0.47^b	6.03±1.06^{ab}	6.12±0.52^{ab}	6.33±0.44^a	6.14±0.41^{ab}	0.050
Yolk weight (g)	12.28±0.83	12.73±1.22	11.79±0.76	12.18±1.26	12.10±1.24	0.427
Yolk color score	8.16±0.85	8.62±1.09	8.09±1.29	7.50±0.71	8.04±0.88	0.331
Haugh unit	90.48±11.95	83.51±15.45	85.96±16.84	95.25±4.78	87.39±17.14	0.561
Egg production (%)	72.86±16.04	66.67±10.33	68.33±13.29	62.50±5.00	71.67±7.53	0.643
Feed intake (g/d)	47.13±12.08	51.80±16.51	57.14±26.46	58.41±23.11	58.27±22.91	0.732
FCR	1.19±0.31	1.42±0.45	1.64±0.76	1.74±0.69	1.52±0.47	0.365

หมายเหตุ : ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน ของคุณภาพไข่ไก่, ตัวอักษร a และ b ที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ขั้นตอนการเตรียมกรงเลี้ยงไก่

ภาพภาคผนวกที่ 13 ลักษณะของกรงที่ใช้เลี้ยงไก่
ที่มา อรทัย แดงสวัสดิ์ ถ่ายเมื่อวันที่ 23 มกราคม 2563

ภาพภาคผนวกที่ 14 การผสมโพรไบโอติกในอาหารเลี้ยงไก่
ที่มา อรทัย แดงสวัสดิ์ ถ่ายเมื่อวันที่ 16 มกราคม 2563

ภาพภาคผนวกที่ 15 ลักษณะมูลของไก่

ที่มา อรทัย แดงสวัสดิ์ ถ่ายเมื่อวันที่ 25 กุมภาพันธ์ 2563

การวัดคุณภาพของไข่ไก่

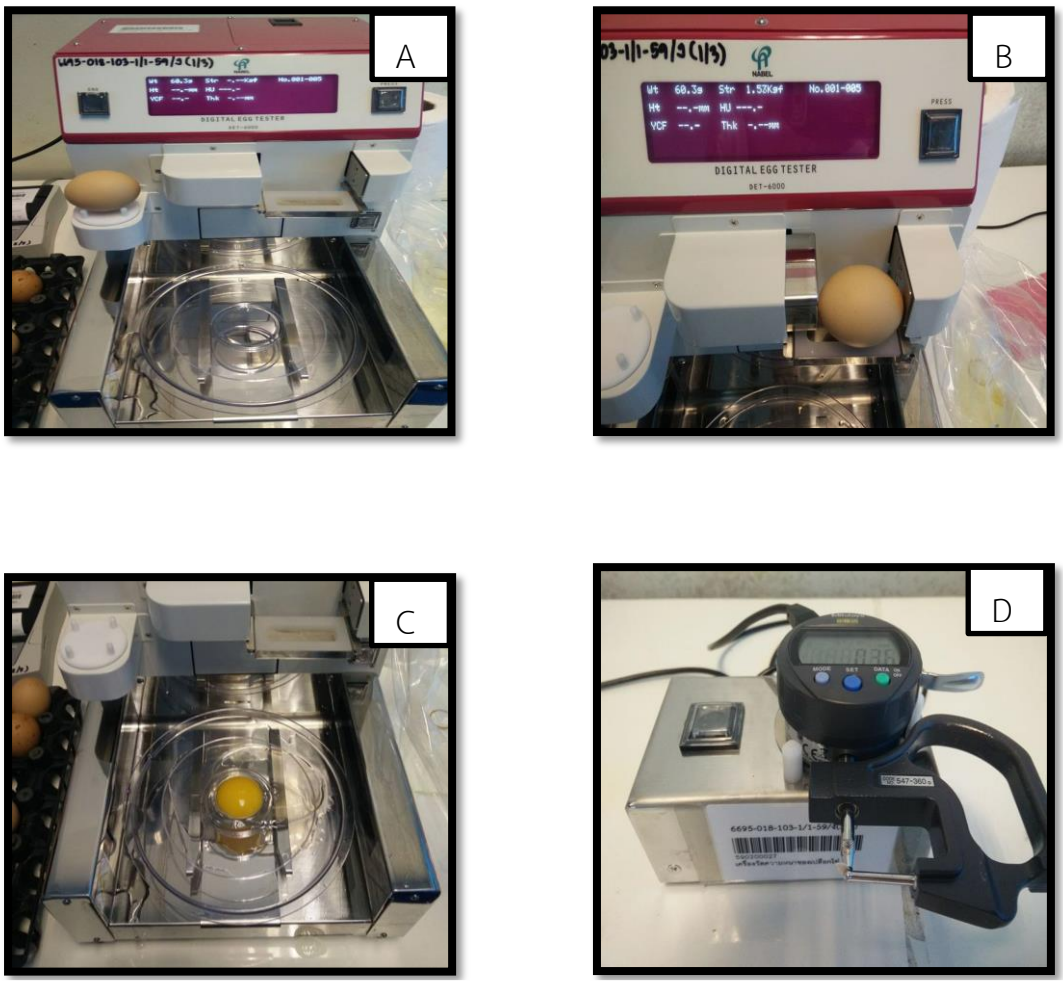
การวัดคุณภาพของไข่ไก่จะใช้เครื่องมือวัดคุณภาพอัตโนมัติ (Digital Egg Tester) แบ่งออกเป็น 4 ประเภท คือ

1. น้ำหนักของไข่ไก่ โดยการนำไข่ไก่ของไก่ทั้ง 5 ซ้ำของแต่ละกลุ่มมาชั่งน้ำหนักโดยใช้ทศนิยม 2 ตำแหน่ง จากนั้นบันทึกน้ำหนักที่ได้

2. วัดความแข็งแรงของเปลือกไข่

3. สีไข่แดง โดยการตอกฟองไข่ที่บนแผ่นของเครื่อง และอ่านผลค่าของสีไข่ โดยใช้ทศนิยม 1 ตำแหน่ง

4. ความหนาของเปลือกไข่ โดยใช้เครื่องไมโครมิเตอร์ Shell Thickness Micrometer โดยหาค่าเฉลี่ยของค่าของเปลือกไข่ส่วนป้าน กลาง และแหลม



ภาพภาคผนวกที่ 16 แสดงการวัดคุณภาพของไข่ไก่โดยเครื่องมือวัดคุณภาพอัตโนมัติ Digital Egg Tester และเครื่องไมโครมิเตอร์ Shell Thickness Micrometer รูป A คือ น้ำหนักของไข่ไก่ รูป B คือ วัดความแข็งแรงของเปลือกไข่ รูป C คือ สีไข่แดง รูป D คือ ความหนาของเปลือกไข่