

การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส จากลำไส้ไก่ไข่เพื่อใช้เป็นสารเสริม โปรไบโอติกในไก่ไข่: ผลต่อสมรรถภาพและคุณภาพไข่

Isolation of *Bacillus* species from chicken intestine for use as probiotic supplement in laying hen: effects on performance and egg quality

อรัทัย แดงสวัสดิ์¹, ชัญญนันท์ นพสุวรรณ¹, เจษฎา รัตนวุฒิ¹ และ ปัทมา เพิ่มพูนพัฒนา^{1*}

Orathai Dangsawat¹, Chanyanan Nopsuwan¹, Jessada Rattanawut¹
and Patima Permpoonpattana^{1*}

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่สร้างสปอร์ จากลำไส้เล็ก ส่วนปลายของไก่ไข่ (Ileum) จำนวน 5 ตัวอย่าง เพื่อศึกษาการเสริมแบคทีเรียโปรไบโอติกในไก่ไข่ เมื่อคัดแยก แบคทีเรียด้วยอาหาร Nutrient Agar ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถคัดแยกเชื้อที่มีลักษณะคล้าย กับ *Bacillus* sp. ได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต คือ HODCN05, HODCN10, HODCN12, HODCN17, TODCN27, TODCN28, TODCN29, TODCN30, TODCN31 และ TODCN35 จากแบคทีเรียทั้งหมด 36 ไอโซเลต นำมา ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่า มี 4 ไอโซเลต ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ทดสอบ คุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติก โดยทดสอบความทนต่อกรด และประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ พบว่ามี 2 ไอโซ เลต คือ TODCN31 และ TODCN35 มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก สามารถทนต่อสภาพความเป็นกรดได้ถึง pH 2.0 ทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ด้วยอาหาร NA พบว่าไอโซเลต TODCN31 และ TODCN35 มีประสิทธิภาพ ในการสร้างสปอร์ คือ 82.4 และ 79.6 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือก TODCN31 นำมาศึกษาประสิทธิภาพเพื่อเป็นสารเสริม โปรไบโอติกในไก่ไข่โดยดูผลต่อสมรรถภาพและคุณภาพของไข่ พบว่าการเสริมสปอร์ของ *Bacillus* sp. ที่มีคุณสมบัติ เป็นโปรไบโอติกในปริมาณ 1×10^6 และ 1×10^8 สปอร์ เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ไม่มีผลต่อสมรรถภาพการลิต แต่มีผล ทำให้น้ำหนักไข่และความหนาของเปลือกไข่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นจาก การศึกษาประสิทธิภาพของการใช้แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่คัดแยกได้จากลำไส้เล็กส่วนปลายของไก่ไข่ สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์ได้

คำสำคัญ : บาซิลลัส, สปอร์, โปรไบโอติก, ลำไส้ไก่, ไข่ไก่

ABSTRACT: This study aimed to isolate *Bacillus* sp. spore forming bacteria from 5 samples of small intestine (Ileum) of laying hens by using Nutrient Agar in order to study bacterial morphology. We found all of 10 isolates was HODCN05, HODCN10, HODCN12, HODCN17, TODCN27, TODCN28, TODCN29, TODCN30, TODCN31 and TODCN35 from total 36 bacteria isolates resemble to *Bacillus* group. All of 10 isolates were done biochemical test and found that 4 isolates had similar properties to *Bacillus* sp. Testing of probiotic properties, tolerances to acid, spore efficiency found that 2 isolates TODCN31 and TODCN35 qualified as a probiotic which can tolerances the

¹ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี

Agricultural Science and Technology, Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Surat Thani Campus

* Corresponding author: patima.pe@psu.ac.th

acidity up to pH 2.0 and spore efficiency on NA found that the TODCN31 and TODCN35 isolates were effective in producing spores of 82.4 and 79.6 percent, respectively. To study the efficacy of *Bacillus* sp. in laying hen, TODCN31 were selected to use as probiotic supplement in laying hen diet for egg performance and quality. Supplementation of *Bacillus* sp. at 1×10^6 and 1×10^8 spores resulted in significantly increased egg weight and eggshell thickness, while productive performance did not differ compared to control. Therefore, the efficacy of *Bacillus* sp. as probiotics supplement in laying hen can be applied as probiotics in animals.

Keywords: *Bacillus* species, spore, probiotic, chicken intestine, egg

บทนำ

ในปัจจุบันไก่ไข่ถือว่าเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งการเลี้ยงไก่ไข่ต้องคำนึงถึงผลผลิตและคุณภาพของไข่มากขึ้นเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค เช่น ไข่มีขนาดใหญ่ เปลือกหนาหรือไข่แดงมีสีแดงเข้ม เกษตรกรผู้เลี้ยงไก่ไข่จึงมีความต้องการปรับปรุงให้สีของไข่แดงเข้มขึ้นโดยเสริมสารสีสังเคราะห์เพื่อเป็นแหล่งสารสีในอาหารไก่ไข่ (อัจฉรา, 2556) นอกจากนี้ผู้ผลิตอาหารไก่ไข่หรือเกษตรกรผู้เลี้ยงไก่ไข่นั้นยังเสริมสารปฏิชีวนะเพื่อให้ได้ผลผลิตมากขึ้น ซึ่งสารปฏิชีวนะเหล่านี้หากไม่ระมัดระวังในการใช้ก็จะทำให้เกิดผลเสียได้ สัตว์ที่รับสารปฏิชีวนะเป็นเวลานานจะส่งผลให้มีการพัฒนาของเชื้อเกิดการดื้อยาขึ้น ทำให้เกิดการตกค้างของสารปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ และส่งผลถึงความปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค ประเทศไทยในฐานะผู้ผลิตและส่งออกสินค้าเกษตรรายใหญ่จึงจำเป็นต้องตระหนักถึงมาตรการหรือการปรับปรุงกระบวนการเพาะเลี้ยงสัตว์ที่หลีกเลี่ยงการใช้สารปฏิชีวนะที่ก่อให้เกิดปัญหาดังกล่าว (Abdelqader et al., 2013)

แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างสปอร์ได้ และมีชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมได้นาน แบคทีเรีย *Bacillus* sp. มีรูปร่างเป็นท่อน (Rod-shape) ติดสีแกรมบวก (Gram positive) เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศหรือสภาวะที่ไม่มีอากาศ (Facultative anaerobic) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ (Endospore) การสร้างสปอร์เป็นการสร้างเพื่อดำรงชีพไม่ใช่เพื่อการสืบพันธุ์ อีกทั้งการสร้างสปอร์และการสร้างสื่อนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลักสำคัญ ได้แก่ ช่วงระยะ

การเจริญเติบโต อุณหภูมิ และอาหาร เป็นต้น และบางชนิดเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก (probiotic) ที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยเมื่อนำมาใช้ในอาหาร ว่ามีประโยชน์เมื่อได้รับเข้าไปในร่างกายในปริมาณที่เหมาะสม สามารถทนความร้อนและทนต่อสภาพแวดล้อมในระบบทางเดินอาหารได้ดี นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติที่เป็นผลดีต่อสุขภาพ ได้แก่ การผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารให้เหมาะสม (Kovacs et al., 2010) ทำให้ระบบย่อยอาหารทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้อีกด้วย (Lee et al., 2017)

จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า มีการใช้โปรไบโอติก เช่น *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Lactococcus* ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เพิ่มมากขึ้น จึงเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งที่มีการวิจัยกันอย่างกว้างขวางและเริ่มเป็นที่ยอมรับกันในปัจจุบัน แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกสามารถช่วยเพิ่มคุณภาพผลผลิตไข่ น้ำหนักไข่ ความหนาของเปลือก และสีของไข่แดง ซึ่ง *Bacillus* sp. ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกสามารถแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ จากสัตว์ทั้งสัตว์บกและสัตว์น้ำ ได้แก่ ลำไส้ปลา (ณัฐนิชา และคณะ, 2557) ระบบทางเดินอาหารของปลากะพง ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก (Nguyen et al., 2015) และมูลลูกสุกร (Gu et al., 2015) จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ได้แก่ โยเกิร์ต นมเปรี้ยว ผักผลไม้ดอง (Angmo et al., 2016) เป็นต้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการคัดแยกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่คัดแยกได้จากลำไส้ไก่

มาใช้เป็นสารเสริมโปรไบโอติกในไก่ไข่เพื่อเพิ่มสมรรถภาพและคุณภาพไข่ เพื่อเป็นแนวทางในการทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะและสารสังเคราะห์ในการเลี้ยงไก่ไข่ ส่งผลให้มีความปลอดภัยต่อการผลิตผลิตภัณฑ์จากไข่และได้อาหารที่ปลอดภัย นอกจากนี้แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจะเป็นประโยชน์กับการเลี้ยงสัตว์ในด้านการส่งเสริมสุขภาพและเพิ่มผลผลิตที่ได้จากสัตว์ ซึ่งผลการวิจัยที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์ และเป็นทางเลือกใหม่ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในสัตว์

วิธีการศึกษา

แหล่งที่มาและการเก็บตัวอย่างลำไส้ไก่

ทำการเก็บตัวอย่างลำไส้เล็กส่วนปลายของไก่ไขพันธุ์ไฮเช็ก บราวน์ อายุ 70 สัปดาห์ จำนวน 5 ตัว ซึ่งเป็นไก่จากฟาร์มของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี โดยทำการฆ่าไก่และผ่าเปิดช่องท้องตามหลักและวิธีการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทำการตัดลำไส้เล็กส่วนปลายของไก่โดยใช้เชือกมัดปลายทั้ง 2 ด้าน แล้วใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อตัดลำไส้ จากนั้นเก็บตัวอย่างลำไส้ใส่ในถุงซิปล็อค และทำการคัดแยกเชื้อโดยทันที (Nguyen et al., 2015)

การคัดแยกเชื้อและการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธีให้ความร้อน (Heat treatment)

นำตัวอย่างลำไส้เล็กส่วนปลายของไก่ 5 กรัม แล้วเจือจางด้วยไซเตียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 45 มิลลิลิตร นำสารละลายที่มีการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1} – 10^{-6} นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ นาน 10 นาที และนำลงไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้องทันที จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) ด้วยวิธีการเกลี่ยเชื้อ โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่าง (กาญจนา, 2556)

การทดสอบการย้อมแกรม และการทดสอบทางชีวเคมีแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp.

นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่ได้รับการแยกให้บริสุทธิ์ ทำการทดสอบการย้อมแกรม เพื่อดูรูปร่างของเซลล์และการสร้างสปอร์ โดยใช้ชุดย้อมแกรม และนำเฉพาะแบคทีเรียที่เป็น แกรมบวกทั้งที่เห็นและไม่เห็นการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ไปทำการทดสอบทางชีวเคมี คือ Motility test, Catalase test, Oxidase test, Indole test และ Starch hydrolysis test โดยอ้างอิงผลการทดสอบ จากผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. ตามรายงานของ Navinchandran et al., (2014)

การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกที่ทนกรด

นำเชื้อที่มีผลการทดสอบทางชีวเคมีเป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. นำมาเลี้ยงต่อในอาหาร Nutrient Broth (NB) ที่ทำการปรับค่า pH 2.0, 2.5 และ 3.0 โดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริก และไซเตียมไฮดรอกไซด์ บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบแบคทีเรียที่รอดชีวิต ด้วยวิธีการเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะที่มีค่า pH 2 – 3.5 (Garcia-Ruiz et al., 2014)

การทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

นำเชื้อที่มีคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกที่ทนกรด นำมาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว NB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที นาน 48 ชั่วโมง การทดสอบหาประสิทธิภาพการสร้างสปอร์โดยแบ่งเป็นสองกลุ่มทดลอง คือ กลุ่มที่ทดสอบด้วยความร้อน นำเชื้อไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และกลุ่มที่ไม่ให้ความร้อน จากนั้นทำการเจือจางเชื้อที่ความเข้มข้น 10^{-1} – 10^{-6} และนำเชื้อที่ความเข้มข้น 10^{-4} – 10^{-6} มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ด้วย

วิธีการเกลี่ยเชื้อ โดยในแต่ละความเข้มข้นจะทำการทดลอง 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง ทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในแต่ละกลุ่มเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ ทำการทดสอบการสร้างสปอร์โดยการนำห้วงถ่ายเชื้อแต่ละเชื้อที่เจริญบนอาหาร NA มาเกลี่ยบนกระจกสไลด์ที่มีน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหยดอยู่เกลี่ยให้เข้ากัน ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า เพื่อดูการสร้างสปอร์ของแบคทีเรีย (Manzo et al., 2013)

ประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ (%) =

$$\frac{\text{จำนวนสปอร์ที่ให้ความร้อน}}{\text{จำนวนสปอร์ที่ไม่ได้ให้ความร้อน}} \times 100$$

การเตรียมสปอร์เชื้อเพื่อใช้เป็นสารเสริมโปรไบโอติกในไก่

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงในอาหารเหลว NB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงบน NA ให้ทั่วบริเวณผิวหน้าอาหารแล้วจึงดูดส่วนเกินของเชื้อออกจากจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นใช้แผ่นสไลด์ที่ฆ่าเชื้อชุดสปอร์บนผิวหน้าอาหารลงในหลอดเซนตริฟิวขนาด 50 มิลลิลิตร ทำการล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่แช่เย็น และนำสปอร์ที่ได้มาให้ความร้อน 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เพื่อทำการฆ่าเซลล์แบคทีเรีย ปรับให้มีปริมาณสปอร์เป็น 1×10^6 และ 1×10^8 สปอร์ และทำการบ้อนเชื้อใส่ในปากไก่โดยตรงด้วยกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร (Gao et al., 2017)

การศึกษาผลของ *Bacillus* sp. ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในไก่ไข่

การทดลองครั้งนี้เป็นการศึกษาในเบื้องต้นของการใช้แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. เพื่อเป็นสารเสริมโปรไบโอติกในไก่ไข่ ทดลองโดยใช้ไก่ไข่พันธุ์ไฮไลน์บราวน์ อายุ 22 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 3 กลุ่มแต่ละกลุ่มมีไก่ 5 ตัว

รวมไก่ทั้งหมด 15 ตัว ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ ทุกกลุ่มทดลองให้เชื้อตามปริมาณที่กำหนด 1 ครั้ง/วัน คือ ช่วงเย็นเวลา 17.00 น. ให้ทุกวันตลอดการทดลอง โดยกลุ่มทดลองประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับสารเสริมโปรไบโอติก), กลุ่มที่ 2 ไก่ได้รับสารเสริมโปรไบโอติกที่ระดับ 1×10^6 สปอร์ และ กลุ่มที่ 3 ไก่ได้รับสารเสริมโปรไบโอติกที่ระดับ 1×10^8 สปอร์ ซึ่งปริมาณของโปรไบโอติกที่ใช้อ้างอิงมาจากการศึกษาในห้องปฏิบัติการก่อนหน้านี้

การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการตรวจวัดคุณภาพไข่ในทุก ๆ สัปดาห์ โดยไข่ที่นำมาตรวจสอบคุณภาพเป็นไข่ที่เก็บในวันสุดท้ายของแต่ละสัปดาห์ โดยเก็บไข่จากไก่ทุกตัว (ซาละ 1 ฟอง) ทำการตรวจสอบน้ำหนักไข่ ความหนาเปลือกไข่ ความแข็งแรงของเปลือกไข่ และสีไข่แดง โดยใช้เครื่องตรวจสอบคุณภาพไข่ (Digital Egg Tester) สำหรับสมรรถภาพการผลิต ได้แก่ น้ำหนักตัวของไข่ เปอร์เซ็นต์ผลผลิตไข่ อัตราการกินอาหารของไก่ และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นผลผลิตไข่นำข้อมูลที่ได้แต่ละกลุ่มการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่า $P < 0.05$ จะพิจารณาว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SPSS version 22

ผลการศึกษา

การศึกษาลักษณะสรีรวิทยาและทางชีวเคมีของเชื้อที่คัดแยกได้

จากการคัดแยก *Bacillus* sp. ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากลำไส้เล็กส่วนปลายของไก่ จำนวน 5 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกเชื้อที่มีลักษณะคล้าย *Bacillus* sp. ทั้งหมด 10 ไอโซเลท ที่ย้อมติดสีแกรมบวกและมีรูปร่างเป็นแท่ง จาก 36 ไอโซเลท ซึ่งมีการศึกษาลักษณะของสี และรูปร่างโคโลนีที่ปรากฏ ซึ่งแบ่งกลุ่มของสีออกเป็น 5 สี คือ ส้ม ส้มครีม เหลือง

เหลืองครีม และครีม ผลการทดสอบทางชีวเคมีของทั้ง 10 ไอโซเลท พบว่ามี 4 ไอโซเลท ที่คล้ายกับ *Bacillus* sp. (Table 1) จากการทดสอบทางชีวเคมี คือ Motility, Indole, Starch hydrolysis, Oxidase และ Catalase ทำให้ได้แบคทีเรียไอโซเลทที่

ผลการทดสอบทางชีวเคมีตรงกับ แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. จำนวน 4 ไอโซเลท คือ HODCN10, TODCN29, TODCN31 และ TODCN35 เพื่อนำมาศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติก

Table 1 Biochemical characteristics of the isolate *Bacillus* sp. from chicken intestine

Isolated No.	Biochemical test				
	Motility test	Indole test	Starch hydrolysis test	Catalase test	Oxidase test
HODCN05	+	-	-	+	-
HODCN10	+	-	+	+	-
HODCN12	-	-	-	+	-
HODCN17	-	-	+	+	-
TODCN27	-	-	+	+	-
TODCN28	+	-	-	+	-
TODCN29	+	-	+	+	-
TODCN30	+	-	-	+	-
TODCN31	+	-	+	+	-
TODCN35	+	-	+	+	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	+	+	-

The increased mark (+) is positive test result and the increased mark (-) is negative test result.

The biochemical tests of *Bacillus* sp. Motility, Indole, Starch hydrolysis, Oxidase, and Catalase the result are +, -, +, + and - respectively

การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกที่ทนกรด

ในการศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกที่ทนกรด จะใช้ 4 ไอโซเลทที่มีผลการทดสอบทางชีวเคมีคล้ายกับ *Bacillus* sp. คือ HODCN10,

TODCN29, TODCN31 และ TODCN35 มาศึกษาการเจริญในสภาวะที่ไม่เหมาะสม โดยการตรวจสอบความสามารถในการทนกรด พบว่า TODCN31 และ TODCN35 สามารถเจริญในสภาวะที่เป็นกรดได้ดีที่สุด (Table 2)

Table 2 Growth of bacteria at pH 2.0, 2.5, 3.0 in NB and spread plate on NA

Isolate No.	Growth of bacteria			
	Control (pH 7.4)	pH 2.0	pH 2.5	pH 3.0
HODCN10	+++++	+	+++	++++
TODCN29	+++++	+	+++	++++
TODCN31	+++++	+++	++++	++++
TODCN35	+++++	+++	++++	++++

The increased mark (+) indicates the number of bacteria growing on NA

จากผลการทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติกที่ทนต่อกรดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ จึงได้ทำการคัดเลือกไอโซเลท TODCN31 และ TODCN35 ซึ่งสามารถทนกรดได้ดีถึงค่า pH 2.0 ซึ่งจะสามารถทนต่อความเป็นกรดในระบบทางเดินอาหารของไก่ได้ จึงเหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกได้

การทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสปอร์

ในการศึกษาประสิทธิภาพการสร้างสปอร์จะใช้ 2 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการทนกรด ได้ดี คือ TODCN31 และ TODCN35 มาศึกษาประสิทธิภาพการสร้างสปอร์บนอาหาร NA โดยจะมีการใช้ความร้อน 80 องศาเซลเซียส เพื่อทำลายเซลล์ปกติ พบว่า TODCN31 มีประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ดีกว่า TODCN35 (Table 3)

Table 3 Spore efficiency of the isolate *Bacillus* sp. from chicken intestine

Isolate No.	Control or Heat	CFU/ml	% Spore efficiency
TODCN31	Control	1.08×10^9	82.4%
	Heat	8.9×10^8	
TODCN35	Control	6.4×10^8	79.6%
	Heat	5.1×10^8	

จากการศึกษาประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียไอโซเลท TODCN31 และ TODCN35 โดยประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ คือ 82.4% และ 79.6% ตามลำดับ จึงได้คัดเลือกไอโซเลท TODCN31 มาใช้เป็นโปรไบโอติกเสริมในไก่ เพราะมีประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ได้ดีที่สุด คุณสมบัติของสปอร์จะทำให้สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ในระบบทางเดินอาหารของไก่ได้

ผลการเสริม *Bacillus* sp. ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกต่อสมรรถภาพและคุณภาพของไข่

ในการใช้แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่มีความสามารถในการสร้างสปอร์ เพื่อเป็นโปรไบโอติกในไก่ไข่ ต่อสมรรถภาพและคุณภาพไข่ในด้านต่าง ๆ คือ

น้ำหนักไข่ ความแข็งแรงของเปลือกไข่ ความหนาของเปลือกไข่ และสีของไข่แดง จากการทดลองพบว่า การบ่มสปอร์ของเชื้อไอโซเลท TODCN31 ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกเข้าไปในปากไก่โดยตรงที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อที่ $0, 1 \times 10^6$ และ 1×10^8 สปอร์เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า การเสริมโปรไบโอติกในไก่ไข่มีผลทำให้น้ำหนักไข่ และความหนาของเปลือกไข่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) (Table 4) ส่วนความแข็งแรงของเปลือกไข่ และสีของไข่แดง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการเสริมโปรไบโอติก สำหรับในด้านสมรรถภาพการผลิตพบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลอง ($P > 0.05$) (Table 5)

Table 4 Effects of *Bacillus* sp. supplementation in laying hen on egg quality

Item	Control	1×10^6 Spores	1×10^8 Spores	SEM	P-value
Egg weight (g)	$54.54^b \pm 0.80$	$56.72^a \pm 0.71$	$57.8^a \pm 1.81$	0.55	0.004
Eggshell strength (kg/cm ²)	3.80 ± 0.27	4.23 ± 0.47	4.11 ± 0.40	0.18	0.239
Eggshell thickness (mm)	$0.34^b \pm 0.005$	$0.36^a \pm 0.004$	$0.36^a \pm 0.004$	0.002	0.0001
Yolk color score	7.36 ± 0.35	7.46 ± 0.36	7.42 ± 0.34	0.16	0.90

^{a-b} Means with different superscripts within the same row differ significantly ($P < 0.05$)

Table 5 Effects of *Bacillus* sp. supplementation in laying hen on productive performance

Item	Control	1x10 ⁶ Spores	1x10 ⁸ Spores	SEM	P-value
Initial body weight (kg)	1.73 ± 0.06	1.72 ± 0.10	1.73 ± 0.01	0.03	0.93
Final body weight (kg)	1.77 ± 0.12	1.78 ± 0.12	1.78 ± 0.06	0.05	0.84
Egg production (%)	95.84 ± 3.71	98.34 ± 2.28	94.58 ± 6.22	1.65	0.28
Feed intake (g/d)	108.93 ± 4.61	109.72 ± 5.78	112.99 ± 3.57	2.37	0.46
Feed conversion ratio	2.12 ± 0.08	1.97 ± 0.10	2.09 ± 0.06	0.04	0.09

วิจารณ์

จากการคัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. จากลำไส้เล็กส่วนปลายของไก่ไข่จำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียที่สร้างสารสีและมีลักษณะโคโลนีคล้ายกับ *Bacillus* sp. ได้จำนวน 36 ไอโซเลท ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nguyen et al. (2015) ที่ได้คัดแยกแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* ที่สร้างสปอร์จากระบบทางเดินอาหารของไก่ จากนั้นนำมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียเพื่อดูลักษณะรูปร่าง เก็บเชื้อที่ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง ทั้งหมด 10 ไอโซเลท ได้แก่ HODCN05, HODCN10, HODCN12, HODCN17, TODCN27, TODCN28, TODCN29, TODCN30, TODCN31 และ TODCN35 นำมาทดสอบทางชีวเคมี คือ Motility test, Catalase test, Oxidase test, Indole test และ Starch hydrolysis test (Navinchandran et al., 2014) จากการทดสอบทางชีวเคมี ทำให้ได้แบคทีเรียไอโซเลทที่ผลการทดสอบทางชีวเคมีตรงกับ แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. จำนวน 4 ไอโซเลท คือ HODCN10, TODCN29, TODCN31 และ TODCN35 นำทั้ง 4 ไอโซเลทมาทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกที่ทนต่อกรด (Garcia-Ruiz et al., 2014) พบว่ามี 2 ไอโซเลท TODCN31 และ TODCN35 ที่สามารถทนกรดได้ดีที่สุดถึงค่า pH 2.0 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gu et al. (2015) ที่ศึกษาศักยภาพโปรไบโอติก *B. coagulans* ที่คัดแยกได้จากมูลลูกสุกร โดยทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติกที่ทนกรดพบว่าสามารถทนกรดได้ถึง pH ต่ำสุด pH 1.0 โดยที่อัตราการรอดชีวิตของ *B. coagulans* ยังสูงถึง 80% นำแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทมาทดสอบประสิทธิภาพการสร้างสปอร์บนอาหาร NA พบว่า TODCN31 และ TODCN35 มีประสิทธิภาพการสร้างสปอร์ 82.4 และ 79.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงเลือก

ไอโซเลท TODCN31 มาใช้เป็นโปรไบโอติกเสริมในไก่ไข่จากการใช้สปอร์ของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp. ไอโซเลท TODCN31 เป็นโปรไบโอติกเสริมในไก่ไข่ต่อสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพของไข่ โดยใช้สปอร์ของเชื้อบ่มในไข่ไก่โดยตรงด้วยกระบอบกักตุนขนาด 1 มิลลิลิตร ผลต่อคุณภาพไข่ ได้แก่ น้ำหนักไข่ ความแข็งแรงของเปลือกไข่ ความหนาของเปลือกไข่ และสีของไข่แดง พบว่า การเสริมสปอร์ *Bacillus* sp. ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในปริมาณ 1x10⁶ และ 1x10⁸ สปอร์ มีผลทำให้น้ำหนักไข่และความหนาของเปลือกไข่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีแนวโน้มความหนาของเปลือกไข่เพิ่มขึ้น 2.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Abdelqader et al. (2013) ที่ได้ศึกษาผลการเสริม *Bacillus subtilis* ในไก่ไข่ ซึ่งจากผลการวิจัยพบว่าทำให้น้ำหนักไข่ และความหนาของเปลือกไข่เพิ่มขึ้น ส่วนความแข็งแรงของเปลือกไข่ และสีไข่แดง ไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สำหรับผลต่อสมรรถภาพการผลิตของไก่ไข่พบว่า ไม่มีความแตกต่างกัน และงานวิจัยของ Lei et al. (2013) ที่อ้างโดย Yang et al. (2017) ที่แสดงให้เห็นว่าการเสริม *B. licheniformis* และ *B. subtilis* ในอาหาร 1.0 × 10⁶ CFU/g มีผลให้คุณภาพไข่ น้ำหนักตัวของไก่เพิ่มขึ้นและทำให้จำนวนของ *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. ลดลง ในการเสริมสปอร์ของเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกควรเสริมในปริมาณ 1x10⁶ สปอร์ ซึ่งเป็นระดับที่เพียงพอต่อการปรับปรุงคุณภาพของไข่ไก่ให้ดีขึ้นได้ จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงถึงผลดีในด้านต่าง ๆ จากการนำโปรไบโอติกมาใช้เสริมในสัตว์ และสามารถเป็นแนวทางในการผลิตผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ ที่ไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างในผลผลิตที่ได้จากสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ได้อีกด้วย

สรุป

การเสริมสปอร์ของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในปริมาณ 1×10^6 และ 1×10^8 สปอร์ เป็นเวลา 5 สัปดาห์ มีผลทำให้น้ำหนักไข่และความหนาของเปลือกไข่เพิ่มขึ้น ซึ่งผลการวิจัยที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้เป็นทางเลือกใหม่ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์

เอกสารอ้างอิง

- กาญจนา เรืองยศจันทนา. 2556. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากมูลสัตว์เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกสายพันธุ์ผสมและการประยุกต์ใช้ในไก่. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพฯ
- ณัฐนิชา สุขไชยพร, ศศิมนัส อุดมจักร์, ประพันธ์ศักดิ์ ศิริระภูมิ, และนนทวิทย์ อารีรัตน์. 2557. การคัดเลือก *Bacillus* spp. จากปลานิลเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. น. 1055-1064. ใน: การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53 อาคารวชิราวุธ 3-6 กุมภาพันธ์ 2558. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน).
- อัครา นิยมเดชา, มงคล คงเสน. 2556. เมทาบอลิซึมและคุณสมบัติของแคโรทีนอยด์ในการเพิ่มความเข้มสีไข่แดง. Princess of Naradhiwas Univ. J. ฉบับพิเศษ: 112-121.
- 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. Ani. Feed Sci. and Tech. 179: 103-111
- Angmo, K., A. S. Kumari, and T. C. Bhalla. 2016. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. LWT - Food Sci. and Tech. 66: 428-435.
- Gao, P., C. Ma, Z. Sun, L. Wang, S. Huang, X. Su, and H. Zhang. 2017. Feed-additive probiotics accelerate yet antibiotics delay intestinal microbiota maturation in broiler chicken. Microbiome. 5: 1-14.
- Garcia-Ruiz, A., D.G. de Llano, A. Esteban-Fernandez, T. Requena, B. Bartolomé, and M.V. Moreno-Arribas. 2014. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. Food Micro. 44: 220-225.
- 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 J. of Micro. and Biotech. 31: 851-863.
- Kovacs, A. T., M. V. Hartkamp, O. P Kuipers, and R. V. Kranenburg. 2010. Genetic Tool Development for a New Host for Biotechnology, the Thermo tolerant Bacterium *Bacillus coagulans*. Appl and Environ. Microbiol. 76: 4085-4088.
- Lee, S., J. Lee, Y. Jin, J. Jeong, Y. H. Chang, Y. Lee, and M. Kim. 2017. Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce. LWT - Food Sci. and Tech. 79: 518-524.
- Manzo, N., D.B. Luccia, R. Isticato, D.E. Apuzzo, D.M. Felice, and E. Ricc. 2013. Pigmentation and sporulation are alternative cell fates in *B. pumilus* SF214. Plos one. 8: 1-12.
- 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 Immun. 36: 38-45.
- 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 Appl. Microbiol. 60: 580-588.
- 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. J. of Integ. Agri. 16: 1383-1392.