

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ที่สำคัญ

- เครื่องทำให้แข็งและแห้ง (Lyophilizer) รุ่น EYELA ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Japan
- เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น pH 1000 ของบริษัท Cyberscan, Singapore
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.
- เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries, Inc., U.S.A.
- ตู้อบเชื้อ (Incubator) รุ่น RO-8 ของบริษัท Memmert, Western Germany
- หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Cooperation, Japan
- ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20⁰ซ (Medical Freezer) ของบริษัท Sanyo, Japan

เคมีภัณฑ์

- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแลคโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส (Lactobacilli MRS broth) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทริปติก ซอย (Tryptic soy broth) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซาลโมเนลลา ชิเจลลา (Salmonella & Shigella agar) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.
- อาหารนมพร่องมันเนย (skim milk) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

จุลินทรีย์

Lactobacillus spp. แยกได้จากตัวอย่างลำไส้ไก่ จากตลาดสดในกรุงเทพมหานคร มีจำนวน 4 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแกงเข้มข้น 5% และเกลือน้ำดี 5% ทั้ง 4 ชนิดคือต่อสารปฏิชีวนะ ได้แก่ แวนโคมัยซินความเข้มข้น 250 ไมโครกรัม และซัลฟาเมทาสินความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม สามารถสร้างสารต่อต้านจุลินทรีย์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในไก่และคนจากการทดลอง *in vitro test* ได้แก่ *Listeria monocytobenes*, *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium* และ *Staphylococcus aureus* รวมทั้งมีสมบัติเป็นโพรไบโอติก สามารถเพิ่มการเจริญเติบโต และด้านทานการติดเชื้อ *Salmonella* Typhimurium ในไก่กระทางได้จากการทดสอบภาคสนาม ทั้ง 4 สายพันธุ์ได้รับการยืนยันผลการศึกษาของการจำแนกกลุ่มและชนิดซึ่งตรงกันกับการพิสูจน์เอกลักษณ์จาก MIRCEN กรุงเทพฯ (ฐิติพงศ์ ธนะรัชติการนนท์, 2539) และได้รับมอบหมายหมายเลขของแบคทีเรีย ดังนี้ คือ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338, *L. bugarius* TISTR 1339, *L. caei* subsp. *tolerans* TISTR 1341 และ *L. jensenii* TISTR 1342

Salmonella Typhimurium จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. Typhimurium* ได้รับเชื้อเพื่อจากคณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, *S. Typhimurium* แยกจากผู้ป่วยที่มีอาการของโรค enteric fevers เชื้อเพื่อจากคณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ *S. Typhimurium* strain B ซึ่งมีสมบัติคือต่อสเตรปโตมัยซินที่ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, ไวตอคลอยเตตราซัยคลิน และเพนนิซิลลินที่ความเข้มข้น 12 และ 16 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ เชื้อเพื่อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วิธีดำเนินการทดลอง

1. นำ *Lactobacillus* spp. แยกได้จากตัวอย่างลำไส้ไก่ เก็บรักษาในรูปผงแห้ง (Lyophilized cells) และตรวจสอบการรอดชีวิต (viability) ทุก 3 เดือน จนครบ 12 เดือน

1.1 เก็บรักษาเซลล์ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยวิธีแช่แข็งและแห้ง (Lyophilization) ดังนี้

preculture โดยเฉพาะเชื้อ 1 ลูบ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแลคโตบาซิลโลเอเอ็ม อาร์ เอส ปริมาตร 250 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก ข้อ 1) บ่มที่อุณหภูมิ 36°C นาน 24-48 ชั่วโมง ถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 3% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแลคโตบาซิลโลเอเอ็ม อาร์ เอส

ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บ่มที่ 36°C จนเซลล์เข้าสู่ช่วงปลาย log phase จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยเขย่าให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันและถ่ายลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว พร้อมผสมอาหารนมพร่องมันเนย 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ลงในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตรอย่างละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนนำไปเข้าเครื่องทำให้แข็งและแห้ง (Lyophilizer) ต่อไป หลังจากสิ้นสุดทุกขั้นตอนในการทำให้แข็งและแห้ง ตัวอย่างที่ได้จะมีลักษณะแห้ง นำไปเก็บรักษาที่ -20°C

1.2 ตรวจสอบการรอดชีวิต (viability) ของเซลล์ในรูปผงแห้งทั้ง 4 สายพันธุ์ ภายใต้ภาวะการเก็บที่อุณหภูมิ -20°C ทุก 3 เดือน ตั้งแต่ 0, 3, 6, 9 และ 12 เดือน ตามลำดับ

นำเซลล์ในรูปผงแห้งของแต่ละสายพันธุ์ ตรวจสอบการรอดชีวิต โดยชั่งตัวอย่าง 1 กรัม นำมาทำ serial dilution ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนัก/ปริมาตร) การสุ่มตัวอย่าง ทำ 3 ซ้ำในแต่ละสายพันธุ์ ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total cell counts (CFU/ g)) (ภาคผนวก ค ข้อ 2) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิลโล เอ็ม อาร์ เอส ทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24-48 ชั่วโมง

2. เปรียบเทียบการรอดชีวิต (viability) ของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ เมื่อนำมาผสมในน้ำดื่มและในอาหารไก่สำเร็จรูป

2.1 ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและแลคติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารไก่สำเร็จรูปผสมสารปฏิชีวนะ 3 ขนาด โดยชั่งตัวอย่าง 1 กรัม นำมาทำ dilution ที่เหมาะสมในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติก ซอย (ภาคผนวก ข ข้อ 3) ควบคู่ไปกับการทำ heat shock bacteria โดยนำหลอด dilution ที่เหมาะสม ต้มที่อุณหภูมิ 80°C นาน 10 นาที เมื่อครบเวลาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติก ซอย จากนั้นตรวจนับจำนวนแลคติกแอซิดแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิลโล เอ็ม อาร์ เอส ที่มีบรอมเครซอลเพอเพิลเป็นอินดิเคเตอร์

2.2 ตรวจสอบการรอดชีวิตของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมทั้ง 4 สายพันธุ์ในน้ำดื่มและในอาหารไก่ โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 10^9 CFU/g ในอัตราส่วน 1:1:1:1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ผสมลงในน้ำกรอง และอาหารไก่สำเร็จรูปในอัตราส่วน 1:1000 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ 1 :1000 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 21°C และ 30°C เมื่อครบทุก 12 ชั่วโมง ตรวจสอบการรอดชีวิตโดยสุ่มตัวอย่างนำมาทำ serial dilution ใน

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนัก/ ปริมาตร) ตรวจสอบจำนวน *Lactobacillus* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิลโล เอ็ม อาร์ เอส ทำ 2 ซ้ำ

3. การทดสอบภาคสนามเพื่อตรวจสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการเจริญเติบโตของไก่พันธุ์เนื้อ

ใช้ลูกไก่พันธุ์เนื้อ CB-13 -97 C-CN คณะแพศ อายุ 1 วัน ทำการเลี้ยง 42 วัน จำนวน 480 ตัว โดยแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 5 กลุ่ม (Treatment) กลุ่มละ 12 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ลูกไก่ 8 ตัว รวม 96 ตัว ทั้ง 5 กลุ่ม 480 ตัว ให้อาหารไก่สำเร็จรูปของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ (มหาชน) จำกัด คือ สูตรผสมสารปฏิชีวนะ CB-I-852 เม็ดเล็ก สำหรับไก่เล็ก (1-19 วัน) และ CB-II-852 เม็ดกลาง สำหรับไก่รุ่น (19-42 วัน) สูตรไม่ผสมสารปฏิชีวนะ CB-I-853 เม็ดเล็ก สำหรับไก่เล็ก (1-19 วัน) และ CB-II-853 เม็ดกลาง สำหรับไก่รุ่น (19-42 วัน) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มควบคุม ไก่ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะ สูตร CB-I-852 และ CB-II-852 ตามช่วงอายุ

กลุ่มที่ 2 ไก่ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะ สูตร CB-I-852 และ CB-II-852 ตามช่วงอายุ และผสมโพรบิโอดีทิก

กลุ่มที่ 3 ไก่ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะ สูตร CB-I-852 และ CB-II-852 ตามช่วงอายุ และผสมโพรบิโอดีทิกในน้ำดื่ม

กลุ่มที่ 4 ไก่ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะ สูตร CB-I-853 และ CB-II-853 ตามช่วงอายุ และผสมโพรบิโอดีทิก

กลุ่มที่ 5 ไก่ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะ สูตร CB-I-853 และ CB-II-853 ตามช่วงอายุ และผสมโพรบิโอดีทิกในน้ำดื่ม

ในไก่กลุ่มทดลองที่ได้รับโพรบิโอดีทิก จะให้เชื้อทุก 3 วันนับตั้งแต่ไก่อายุ 1 วัน โดยอดน้ำและอาหารก่อนไก่ได้รับโพรบิโอดีทิก หลังจากผสมในอาหารและในน้ำดื่มแล้วมีความเข้มข้น 10^8 CFU/g หรือ CFU/ml ตามลำดับ ทำการชั่งน้ำหนักไก่เมื่ออายุ 0, 19 และ 42 วัน เพื่อเปรียบเทียบและติดตามผลการเจริญเติบโตในแต่ละกลุ่มทดลอง และทุก 9 วัน สุ่มฆ่าไก่กลุ่มละ 3 ตัว ผ่าตัดนำลำไส้ไก่มาทำ Total viable cell count ของแบคทีเรียประจำถิ่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติก ซอย และตรวจสอบ ความสามารถในการอยู่รอดในลำไส้ไก่ของ *Lactobacillus* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิลโล เอ็ม อาร์ เอส นำโคโลนีที่ได้ตรวจสอบยืนยันผลโดยดูลักษณะ

การติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การทดสอบการสร้างเอ็นไซม์อะมิเลส การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ (ภาคผนวก ค ข้อ 3)

4. การทดสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S. Typhimurium* ในไก่พันธุ์เนื้อ

ใช้ลูกไก่พันธุ์เนื้อ CB-14 -97 C-CN คณะแพศ อายุ 1 วัน ทำการเลี้ยง 36 วัน จำนวน 384 ตัว โดยแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 6 กลุ่ม (Treatment) กลุ่มละ 8 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ลูกไก่ 8 ตัว รวม 64 ตัว รวม 6 กลุ่ม 384 ตัว โดยป้อน *S. Typhimurium* ให้ไก่ในแต่ละกลุ่มทดลอง จำนวน 3 ครั้ง คือ ไก่อายุ 1 วัน ให้ 10^3 CFU/ml อายุ 12 วัน ให้ 10^6 CFU/ml ใช้สายพันธุ์ที่ได้รับจากคณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และอายุ 21 วัน ให้ 10^9 CFU/ml ใช้สายพันธุ์ก่อให้เกิดโรค enteric fevers ในคน เอื้อเพื่อจากคณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุก 3 วัน ผสม *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารและน้ำดื่ม 10^8 CFU/g และ CFU/ml ตามลำดับ ให้ไก่ตั้งแต่อายุ 1 วัน จัดกลุ่มทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ไก่ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะสูตร CB-I-8521 และ CB-II- 852 ตามช่วงอายุ และให้ *S. Typhimurium*

กลุ่มที่ 2 ไก่ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะสูตร CB-I-852 และ CB-II- 852 ตามช่วงอายุ และผสมโพรไบโอติก และให้ *S. Typhimurium*

กลุ่มที่ 3 ไก่ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะสูตร CB-I-852 และ CB-II- 852 ตามช่วงอายุ และผสมโพรไบโอติก

กลุ่มที่ 4 ไก่ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะสูตร CB-I-853 และ CB-II- 853 ตามช่วงอายุ และให้ *S. Typhimurium*

กลุ่มที่ 5 ไก่ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะสูตร CB-I-853 และ CB-II- 853 ตามช่วงอายุและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่มและให้ *S. Typhimurium*

กลุ่มที่ 6 ไก่ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะสูตร CB-I-853 และ CB-II- 853 ตามช่วงอายุและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม

ทำการชั่งน้ำหนักไก่เมื่ออายุ 1, 19 และ 36 วัน เพื่อเปรียบเทียบและติดตามผลการเจริญเติบโตในแต่ละกลุ่มทดลอง และทุก 9 วัน สุ่มฆ่าไก่กลุ่มละ 2 ตัว ฆ่าตัดนำลำไส้ไก่มาทำ Total viable cell count ของแบคทีเรียประจำถิ่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติก ซอย ตรวจสอบความสามารถในการอยู่รอดในลำไส้ไก่และด้านทานการติดเชื้อ *S. Typhimurium* ของ *Lactobacillus* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิลโลเอม อาร์ เอส นำโคโลนีที่ได้ตรวจสอบยืนยันผลโดยดูลักษณะการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การทดสอบการสร้างเอ็นไซม์อะไมเลส การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ การตรวจหาปริมาณ *S. Typhimurium* modified จากวิธี Standard Conventional Method (BAM / AOAC / Canada / ISO) (ภาคผนวก ค ข้อ 3) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซาลโมเนลลา ซิเจลลา (ภาคผนวก ก ข้อ 4) พร้อมทั้งตรวจสอบยืนยันผลทางชีวเคมีในอาหารเลี้ยงเชื้อที เอส ไอ (Triple Sugar Iron agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 5), แอล ไค เอ (Lysine Indole agar) (ภาคผนวก ก ข้อ 6) และอาหารทดสอบการเคลื่อนที่และสร้างอินโดล (Semisolid Indole Motility Test Medium) (ภาคผนวก ก ข้อ 7)

5. การทดสอบยืนยันผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S. Typhimurium* ในไก่พันธุ์พื้นบ้านไทย

ใช้ลูกไก่พันธุ์พื้นบ้านไทย คณะแพศ อายุ 1 วัน ทำการเลี้ยง 30 วัน จำนวน 48 ตัว โดยแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 3 กลุ่ม (Treatment) กลุ่มละ 2 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ลูกไก่ 8 ตัว รวม 16 ตัว ให้อาหารไก่สำเร็จรูปผสมสารปฏิชีวนะของบริษัทชนะพันธุ์ อุตสาหกรรม จำกัด สูตรสำหรับไก่เนื้อ อายุ 1-19 วัน ให้อาหารเม็ดเล็กละเอียด อายุ 20-30 วัน ให้อาหารเม็ดใหญ่ให้เชื้อ *S. Typhimurium* เมื่อไก่อายุครบ 10 วัน โดยการป้อนใช้ความเข้มข้น 10^5 CFU/ml ใช้สายพันธุ์ที่เชื้อเพื่อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ซึ่งมีสมบัติดื้อต่อสารปฏิชีวนะ (drug resistant marker) และทุก 3 วัน ผสม *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสม ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารและน้ำดื่ม 10^5 CFU/g และ CFU/ml ตามลำดับ ให้ไก่ตั้งแต่อายุ 1 วัน จัดกลุ่มทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มควบคุมไก่ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะ และให้ *S. Typhimurium*

กลุ่มที่ 2 ไก่ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและเสริมโพรไบโอติกทุก 3 วัน และให้

S. Typhimurium

กลุ่มที่ 3 ไก่ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่มทุก 3 วัน และให้

S. Typhimurium

ทำการชั่งน้ำหนักไก่เมื่ออายุ 1, 10, 20 และ 30 วัน เพื่อเปรียบเทียบและติดตามผลการเจริญเติบโตในแต่ละกลุ่มทดลอง และทุก 10 วัน สุ่มมาไก่กลุ่มละ 1 ตัว ฆ่าสดนำละมุล

ไก่มาทำ Total viable cell count ของแบคทีเรียประจำถิ่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติก ซอย ตรวจสอบความสามารถในการอยู่รอดในลำไส้ไก่รวมทั้งในมูลไก่และการต้านทานติดเชื้อ

S. Typhimurium ของ *Lactobacillus* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิลโลเอ็ม อาร์ เอส นำโคโลนีที่ได้ตรวจสอบยืนยันผลโดยดูลักษณะการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การทดสอบการสร้างเอ็นไซม์อะไมเลส การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ การตรวจหาปริมาณ *S. Typhimurium* modified จากวิธี Standard Conventional Method (BAM/AOAC/Canada/ ISO) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซาลโมเนลลา ซีเจ ลลา ทำการทดสอบยืนยันผลโดยคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่า เป็น *S. Typhimurium* ขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งยูรีเอส (Urease agar plate) (ภาคผนวก ก ข้อ 8) และบนอาหารเลี้ยงเชื้อทริปติก ซอย ที่ผสมสเตรปโตมัยซิน คลอเตตราซัยคลิน และเพนนิซิลลินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่า เป็น *S. Typhimurium* strain B นำมาตรวจสอบยืนยันผลทางชีวเคมีในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ เอส ไอ (Triple Sugar Iron agar) , แอล ไอ เอ (Lysine Indole agar) และอาหารทดสอบการเคลื่อนที่และสร้างอินโดล (Semisolid Indole Motility Test Medium)

การเก็บข้อมูลและการคำนวณ

การทดลองภาคสนามเพื่อตรวจสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการเจริญเติบโตของไก่ การทดสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S. Typhimurium* ในไก่พันธุ์เนื้อ และการทดสอบยืนยันผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S. Typhimurium* ในไก่พันธุ์พื้นบ้านไทย มีข้อมูลที่ต้องบันทึกและคำนวณ คือ

1. การเจริญเติบโต โดยการชั่งน้ำหนักในแต่ละเช้าแล้วเฉลี่ย นำน้ำหนักเฉลี่ยในแต่ละเช้ารวมกันแล้วเฉลี่ยเป็นน้ำหนักเฉลี่ยรวม คำนวณน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นในแต่ละช่วงเวลา

2. ปริมาณอาหารที่ไก่แต่ละกลุ่มกิน

3. คำนวณประสิทธิภาพการใช้อาหาร (feed conversion) โดยใช้สูตร

$$\text{ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (FCR)} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ไก่กิน}}{\text{น้ำหนักตัวไก่ที่เพิ่มขึ้น}}$$

- 4. คำนวน % ความสัมพันธ์ของน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้น
 % ความสัมพันธ์ของน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้น
 = $\frac{\text{น้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นในไก่กลุ่มทดลอง} - \text{น้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นในไก่กลุ่มควบคุม}}{\text{น้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นในไก่กลุ่มทดลอง}} \times 100$
- 5. อัตราการตายโดยคิดเป็นร้อยละของไก่แต่ละกลุ่มทดลอง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำน้ำหนักเฉลี่ยและค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่ในแต่ละกลุ่มทดลองวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ด้วยความแปรปรวน (Analysis of variance) ใช้ SPSS-PC Program for probit analysis ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบผลการทดลองโดยใช้ Duncan's multiple range test (จรัญ, 2534)

สถานที่ทดลอง

1. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 ใช้เพื่อเตรียม *Lactobacillus* spp. ผงแห้ง และ *S. Typhimurium* เพื่อทดสอบภาคสนาม และใช้ในการทดสอบยืนยันผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S. Typhimurium* ในไก่พันธุ์พื้นบ้านไทย

อุปกรณ์การทดสอบภาคสนาม มีดังนี้

- 1. กรงเลี้ยงมีขนาด 23.5 x 24 x 28 นิ้ว ใช้เลี้ยงลูกไก่ตั้งแต่อายุ 1 - 30 วัน
- 2. หลอดไฟสำหรับกกลูกไก่ขนาด 60 วัตต์ กรงละ 1 ดวง
- 3. ใช้ขวดน้ำพลาสติกขนาด 2.5 ลิตร 1 ขวดต่อกรง และรางอาหารสำหรับไก่เล็กในช่วง 1-10 วัน 1 รางต่อกรง ช่วง 10-20 วัน 2 รางต่อกรง และช่วง 20-30 วัน ใช้รางอาหารสำหรับไก่ใหญ่ 2 รางต่อกรง

2. ฟาร์มทดลองโรงเรียนเลี้ยงไก่ของบริษัท กรุงเทพอาหารสัตว์ จำกัด กม. 21 ถนนบางนา-ตราด ใช้ในการทดสอบภาคสนามเพื่อดูผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการเจริญเติบโตของไก่ และการทดสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S. Typhimurium* ในไก่พันธุ์เนื้อ

อุปกรณ์การทดสอบภาคสนาม มีดังนี้

1. กรงเลี้ยงเป็นกรงดับพื้นลวด 4 ชั้น แต่ละชั้นมีขนาด 92 x 37 x 12 นิ้ว จำนวน 4 กรงใช้เลี้ยงลูกไก่ ตั้งแต่อายุ 1- 42 วัน

2. หลอดไฟสำหรับกกลูกไก่ขนาด 60 วัตต์ กรงละ 1 ดวง

3. ขวดน้ำและรางอาหารสำหรับไก่เล็ก (1- 18 วัน)

ช่วง 1-10 วันแรก ใช้ขวดน้ำพลาสติกสำหรับไก่เล็ก ขนาด 2.5 ลิตร ต่อกรง

ช่วง 11-18 วัน ใช้รางน้ำติดข้างกรงดับ 1 รางต่อ 2 กรง และใช้รางอาหารสำหรับไก่เล็ก 1 รางต่อกรง

4. รางน้ำและรางอาหารสำหรับไก่ใหญ่ (19-42 วัน) ใช้รางน้ำและรางอาหารติดข้างกรงดับ โดยเฉพาะอย่างละ 1 รางต่อ 4 กรง

พันธุ์ไก่และอาหารไก่

1. การทดสอบภาคสนามเพื่อตรวจสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการเจริญเติบโตของไก่ใช้ลูกไก่พันธุ์เนื้อ CB-13-97 C-CN อายุ 1 วัน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (มหาจน) จำกัด และการทดสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S. Typhimurium* ในไก่พันธุ์เนื้อ ใช้ลูกไก่พันธุ์เนื้อ CB-14-97 C-CN อายุ 1 วัน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (มหาจน) จำกัด

การทดสอบภาคสนามทั้ง 2 การทดลองใช้อาหารไก่ 2 สูตรของบริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ (มหาจน) จำกัด เช่นเดียวกัน คือ

1. CB-I-852 อาหารเม็ดเล็กใช้สำหรับไก่เล็กอายุ 1-18 วัน และ CB-II-852 อาหารเม็ดกลางใช้สำหรับไก่รุ่นอายุ 20-42 วัน ซึ่งเป็นสูตรทางการค้าผสมสารปฏิชีวนะ

2. CB-I-853 อาหารเม็ดเล็กใช้สำหรับไก่เล็กอายุ 1-18 วัน และ CB-II-853 อาหารเม็ดกลางใช้สำหรับไก่รุ่นอายุ 20-42 วัน ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่ไม่ผสมสารปฏิชีวนะ

2. การทดสอบยืนยันผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S. Typhimurium* ในไก่พันธุ์พื้นบ้านไทย ใช้ลูกไก่พันธุ์พื้นบ้านไทย อายุ 1 วัน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (มหาจน) จำกัด

อาหารไก่สำเร็จรูปใช้ของบริษัทชนะพันธุ์อุตสาหกรรม จำกัด อายุ 1-19 วัน ให้อาหารสูตร 1 เม็ดเล็กละเอียด อายุ 20- 30 วัน ให้อาหารสูตร 2 เม็ดใหญ่

สรุปวิธีการทดลอง

1. แผนภูมิการทดสอบภาคสนามเพื่อตรวจสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการเจริญเติบโตของไก่

ผสม *Lactobacillus* spp. ผงแห้ง 4 สายพันธุ์

อัตราส่วน 1:1:1:1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก)



ผสมในอาหารไก่สำเร็จรูปชนิดเม็ดและน้ำดื่ม

อัตราส่วน 1:1,000 มีความเข้มข้นสุดท้าย 10^8 CFU/g และ CFU/ml

ตรวจสอบความเข้มข้นจากตัวอย่างน้ำและอาหาร



นำโพรบิโอติกให้ไก่กิน ทุก 3 วัน ตั้งแต่ไก่อายุ 1 วัน

ไก่ 1 กลุ่มประกอบด้วย 12 ซ้ำ ซ้ำละ 8 ตัว รวม 96 ตัว ทั้งหมด 5 กลุ่ม 480 ตัว ดังนี้

1. กลุ่มควบคุม ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะ
2. ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและเสริมโพรบิโอติก
3. ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและเสริมโพรบิโอติกในน้ำดื่ม
5. ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรบิโอติกในน้ำดื่ม



สุ่มตัวอย่างไล่ไก่กลุ่มทดลองละ 3 ตัว ทุก 9 วัน ตรวจหา

- จำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกชอย
- แลคติกแอซิดแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิลโล เอ็ม อาร์ เอส



ทำ 2 ซ้ำ

ทดสอบยืนยันผลโคโลนีของ *Lactobacillus* spp. ด้วยวิธีทางชีวเคมี



ดูผลของโพรบิโอติกต่อการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่

โดยชั่งน้ำหนักและปริมาณอาหารที่กิน ทุก 1, 19 และ 42 วัน

2. แผนปฏิบัติการทดสอบภาคสนามเพื่อตรวจสอบผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสมต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S. Typhimurium* ในไก่พันธุ์เนื้อ

ผสม *Lactobacillus* spp. ผงแห้ง 4 สายพันธุ์

อัตราส่วน 1:1:1:1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก)



ผสมในอาหารไก่สำเร็จรูปชนิดเม็ดและในน้ำดื่ม

อัตราส่วน 1:1,000 มีความเข้มข้นสุดท้าย 10^6 CFU/g และ CFU/ml

ตรวจสอบความเข้มข้นจากตัวอย่างน้ำและอาหาร



นำโพรไบโอติกให้ไก่กิน ทุก 3 วัน ตั้งแต่ไก่อายุ 1 วัน

ไก่ 1 กลุ่มประกอบด้วย 8 ซ้ำ ซ้ำละ 8 ตัว รวม 64 ตัว ทั้งหมด 6 กลุ่ม 384 ตัว ดังนี้

1. กลุ่มควบคุมได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะ + ป้อน *S. Typhimurium*
2. ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติก + ป้อน *S. Typhimurium*
3. ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติก
4. ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะ + ป้อน *S. Typhimurium*
5. ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม + ป้อน *S. Typhimurium*
6. ได้รับอาหารไม่ผสมสารปฏิชีวนะและผสมโพรไบโอติกในน้ำดื่ม



ป้อน *S. Typhimurium* จำนวน 3 ครั้ง คือ

อายุ 1 วัน (10^3 CFU/ml) อายุ 12 วัน (10^6 CFU/ml) และ 21 วัน (10^6 CFU/ml)



สุ่มตัวอย่างลำไส้ไก่กลุ่มทดลองละ 2 ตัว ทุก 9 วัน ตรวจสอบ

- จำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกชอย
- แลคติกแอซิดแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิลไล เอ็ม อาร์ เอส
- *S. Typhimurium* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซาลโมเนลลา ซีเจลลา





นำโคลนที่คาดว่าจะเป็น *Lactobacillus* spp.
และ *S. Typhimurium* ทดสอบยืนยันผลด้วยวิธีทางชีวเคมี



ดูผลของโพรไบโอติกต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S. Typhimurium*
การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่ โดยซั้งน้ำหนัก
และปริมาณอาหารที่กิน ทุก 1, 19 และ 36 วัน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. แผนปฏิบัติการทดสอบภาคสนามเพื่อยืนยันผลของ *Lactobacillus* spp. ผงแห้งแบบผสม ต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S. Typhimurium* ในไก่พันธุ์พื้นบ้านไทย

ผสม *Lactobacillus* spp. ผงแห้ง 4 สายพันธุ์

ในอัตราส่วน 1:1:1:1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก)



ผสมในอาหารไก่สำเร็จรูปชนิดเม็ดและในน้ำดื่ม

อัตราส่วน 1:1,000 มีความเข้มข้นสุดท้าย 10^6 CFU/g และ CFU/ml

ตรวจสอบความเข้มข้นจากตัวอย่างน้ำและอาหาร



นำโพรบิโอติกให้ไก่กิน ทุก 3 วันตั้งแต่ไก่อายุ 1 วัน

ไก่ 1 กลุ่มมี 16 ตัว ประกอบด้วย 2 ซ้ำ ซ้ำละ 8 ตัว รวม 3 กลุ่ม 48 ตัว ดังนี้

1. กลุ่มควบคุมได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะ
2. ไก่ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและเสริมโพรบิโอติก
3. ไก่ได้รับอาหารผสมสารปฏิชีวนะและน้ำดื่มเสริมโพรบิโอติก



อายุ 10 วัน ป้อน *S. Typhimurium* strain B

(drug resistant marker) (10^8 CFU/ml)



สุ่มตัวอย่างลำไส้ไก่กลุ่มทดลองละ 1 ตัว ทุก 10 วัน ตรวจสอบหา

- จำนวนแบคทีเรียประจำถิ่นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทริปติกชอย
- แลคติกแอซิดแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิลโล เอ็ม อาร์ เอส
- *S. Typhimurium* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งซาลโมเนลลา ชิเจลลา



นำโคโลนีที่คาดว่าเป็น *Lactobacillus* spp.

และ *S. Typhimurium* ทดสอบยืนยันผลด้วยวิธีทางชีวเคมี



ดูผลของโพรบิโอติกต่อการต้านทานการติดเชื้อ *S. Typhimurium* การเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารของไก่ โดยชั่งน้ำหนัก

และปริมาณอาหารที่กิน ทุก 1, 10, 20 และ 30 วัน