BSJ
BURAPHA SCIENCE JOURNAL
ISSN 2985-0983 (online)

วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 30 (ฉบับที่ 1) มกราคม – เมษายน พ.ศ. 2568
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 30 (No.1) January – April 2025 บทความวิจัย

การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกที่สามารถผลิตสารกาบ้า เพื่อประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมในไก่ไข่

Selection of Probiotic Bacterium Capable of GABA Production for the Application as Feed Supplement in Laying Hens

ชลดา ปาทำมา, ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน*, ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และ ทิพปภา พิสิษฐ์กุล

Chonlada Pathamma, Pairote Wongputtisin*, Piyanuch Niamsup and Tippapha Pisithkul

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประเทศไทย

Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University, Thailand

Received : 5 December 2024, Received in revised form : 18 March 2025, Accepted : 31 March 2025

Available online : 11 April 2025

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : ปัญหาหลักที่กระทบต่อการเลี้ยงไก่ไข่ในประเทศไทยโดยเฉพาะอย่างยิ่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการผลิตไข่คือโรคระบาดและความเครียดอันเนื่องมาจากความร้อน การเสริมแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีชีวิตในอาหารไก่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางว่ามีประสิทธิภาพลดการติดเชื้อ และช่วยส่งเสริมสุขภาพไก่ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ ที่ปัจจุบันถูกสั่งห้ามใช้อย่างเข้มงวดในหลายประเทศและรวมถึงประเทศไทย อีกทั้งกรดแกมม่า – อะมิโนบิวทิริก (สารกาบ้า) มีบทบาทช่วยลดผลกระทบจากความเครียดอันเนื่องมาจากความร้อนที่มีต่อการเจริญและประสิทธิภาพการผลิตไข่ไก่ได้ ดังนั้นการค้นพบสายพันธุ์แบคทีเรียโพรไบโอติกที่สามารถผลิตสารกาบ้าได้ควบคู่กันและมีความจำเพาะสูงต่อทางเดินอาหารของไก่นับได้ว่าเป็นกลยุทธที่มีศักยภาพเพื่อนำมาใช้ในการเลี้ยงไก่ไข่และการผลิตไข่ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกที่สามารถผลิตสารกาบ้าได้โดยคัดแยกมาจากทางเดินอาหารของไก่ไข่เพื่อเป้าหมายในการลดผลกระทบจากปัญหาดังกล่าว และเพื่อทดสอบการรอดชีวิตของโพรไบโอติกหลังการขึ้นรูปเป็นผงผลิตภัณฑ์

วิธีดำเนินการวิจัย : คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากทวารร่วมของไก่ไข่โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร de Man Rogosa and Sharpe (MRS) จากนั้นทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียทุกไอโซเลตดังกล่าวในระดับ *in vitro* ได้แก่ กิจกรรมย่อยเม็ดเลือดแดงในอาหารแข็งสูตร sheep blood (แอลฟ่า เบต้า และแกมม่า - ฮีโมไลซีส) ความสามารถในการเจริญภายใต้สภาวะกรด (pH 2.0 2.5 3.0 และ 3.5) และน้ำดี (เข้มข้นร้อยละ 0.3 และ 1.0 (w/v)) คุณสมบัติความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ที่ประเมินจากความสามารถของเซลล์ในการจับกันเองเมื่อทดสอบด้วยการเติมสารโทลูอีน ความไวต่อยาปฏิชีวนะจำนวน 13 ชนิดโดยแปลผลเทียบกับมาตรฐานของ the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) และฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารบางชนิด ได้แก่ *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhi และ *Staphylococcus aureus* ด้วยเทคนิค spot on lawn จากนั้นทดสอบความสามารถการผลิตสารกาบ้าในอาหารเหลวสูตร MRS ที่เสริมด้วยสารโมโนโซเดียมกลูตาเมตความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (w/v) วิเคราะห์สารกาบ้า

เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพด้วยเทคนิคทางสเปกโทรโฟโตเมทรีและโครมาโทกราฟีผิวบาง ตามลำดับ ระบุชนิดของไอโซเลตที่คัดเลือกด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน 16S rRNA เทียบกับฐานข้อมูล GenBank และท้ายที่สุดทำการขึ้นรูปเป็นผงโพรไบโอติกโดยผสมกับรำข้าวแล้วทำแห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง และทดสอบการรอดชีวิตเมื่อเก็บรักษาผงโพรไบโอติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 สัปดาห์ในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ปิดสนิท

ผลการวิจัย : ผลการศึกษาพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียแกรมบวก ไม่ผลิตเอนไซม์คะตะเลส และผลิตกรดจำนวน 42 ไอโซเลตจากตัวอย่างมูลที่เก็บจากรูทวารร่วมของไก่ไข่ แบ่งเป็นแบคทีเรียรูปร่างกลมและท่อนจำนวน 5 และ 37 ไอโซเลต ตามลำดับ ภายหลังการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกเบื้องต้นพบว่าไอโซเลต LH5 ซึ่งเซลล์มีรูปร่างกลม เรียงตัวเป็นคู่และสายสั้นมีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกได้ดีที่สุดเมื่อทดสอบภายใต้สภาวะจำลองของทางเดินอาหารไก่ โดยสามารถเจริญได้ที่ pH 2.0 – 3.5 และมีน้ำดีความเข้มข้นสูงร้อยละ 1.0 (w/v) พื้นผิวเซลล์แสดงคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำระดับปานกลางโดยมีค่า %CSH เท่ากับ 57 ไวต่อยาปฏิชีวนะชนิด penicillin, ampicillin, vancomycin, cefoxitin, chloramphenicol, clindamycin, ceftriaxone, ciprofloxacin, cephalothin และ rifampicin แต่ต้านยาปฏิชีวนะชนิด gentamycin, erythromycin และ nalidixic acid ไอโซเลต LH5 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคชนิด *S.* Typhi ที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคอันตรายสาเหตุของการระบาดของโรค Salmonellosis และยับยั้ง *S. aureus* ด้วย ไอโซเลตนี้ไม่แสดงคุณสมบัติการสลายเม็ดเลือดแดงในอาหารแข็ง sheep blood (แกมม่า - ฮีโมไลซีส) และได้รับการระบุชนิดเป็น *Enterococcus faecium* ด้วยค่า %similarity ร้อยละ 100 *E. faecium* LH5 ยังสามารถผลิตสารกาบ้าได้ในปริมาณ 09.05 mg/L ซึ่งสามารถตรวจพบได้อย่างชัดเจนบนแผ่นอลูมิเนียมที่เคลือบด้วยซิลิกาเจล นอกจากนี้ เซลล์ของ *E. faecium* LH5 ในผงโพรไบโอติกมีการรอดชีวิตสูงถึงร้อยละ 95.39 $\pm$ 0.07 และ 94.15 $\pm$ 0.19 หลังการเก็บรักษา 12 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) ตามลำดับ และไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ระหว่างอุณหภูมิทั้งสองระดับในแต่ละสัปดาห์

สรุปผลการวิจัย : *E. faecium* LH5 เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกและสามารถผลิตสารกาบ้าได้ เซลล์มีความเสถียรต่อกระบวนการขึ้นรูปเป็นผงแห้งและการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นจึงมีแนวโน้มใช้ประโยชน์เป็นสารเสริมชีวนะในอาหารไก่ไข่ต่อไป อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องศึกษาผลของการเสริม *E. faecium* LH5 ที่มีต่อสมรรถนะการเจริญและประสิทธิภาพการผลิตไข่ไก่ทั้งภายใต้สภาวะความเครียดอันเนื่องจากความร้อนและภาวะการติดเชื้อก่อโรคก่อนการประยุกต์ใช้จริงในลักษณะของอาหารเสริมสัตว์

คำสำคัญ : โพรไบโอติก ; สารกาบ้า ; ไก่ไข่ ; ความเครียดอันเนื่องจากความร้อน ; อาหารเสริมสัตว์

Abstract

Background and Objectives : Main problems affecting the raising of laying hens in Thailand, especially on the growth and efficiency of egg production are the epidemics and heat stress. Supplementation of viable probiotic cells to poultry diet has been widely accepted as an effective treatment in the reduction of infection and promoting poultry health instead of the use of antibiotics treatment. Nowadays, the antibiotics supplementation

in the livestock production is restricted and controlled in many countries including Thailand. In addition, the gamma – aminobutyric acid (GABA) substance plays a significant role in mitigation of heat stress impacts on growth and egg production efficiency of laying hens. Thus, the discovery of GABA - producing probiotic strain, a dual - functional feed supplement, with high specificity to poultry gastrointestinal tract is a promising strategy for the laying hens raising and egg production. The objectives of this research were then to screen the probiotic strains capable of GABA production from the digestive tract of laying hens for the application in feed supplement purposes, especially reduction of the impacts from above mentioned problems and to investigate the survivability of the probiotic cells after the formulation of product powder.

Methodology : Isolation of lactic acid bacteria from the cloaca of laying hens was conducted on de Man Rogosa and Sharpe (MRS) agar. Those isolates were subjected to the preliminary *in vitro* tests of their probiotic properties. The tests included the investigation of hemolytic activity (alpha -, beta - and gamma - hemolysis) on sheep blood agar, the growth ability under the acid conditions (pH 2.0, 2.5, 3.0 and 3.5) and the presence of bile (0.3 and 1.0% (w/v)), the cell surface hydrophobicity (%CSH) assessed by the auto-aggregation ability of cells after toluene addition, the antibiotic susceptibility on 13 antibiotics interpreted according to the standard protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), and the antimicrobial activity against some enteric pathogens; i.e. *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhi and *Staphylococcus aureus*, using the spot on lawn technique. Subsequently, the ability of the selected isolates on GABA production in MRS broth supplemented by 0.5% (w/v) monosodium glutamate was studied. GABA was quantitatively and qualitatively determined by using spectrophotometry method and thin layer chromatography (TLC), respectively. Finally, species identification of the selected isolate by the analysis of 16S rRNA gene nucleotide sequencing and used to query GenBank via BLAST was investigated. Furthermore, probiotic powder was formulated by mixing with rice bran and drying by freeze-drying process for further study of the cell survivability when stored at 4°C and room temperature for 12 weeks in the sealed aluminum foil bag.

Main Results : The results showed that 42 isolates of lactic acid bacteria were obtained from the feces samples collected from laying hens cloaca. They were Gram-positive bacteria, non-catalase producing bacteria and capable of acid production. Moreover, it was found that their morphology of cell shapes were coccus and rod (5 cocci- and 37 rod-shape isolates). After the preliminary test of probiotic properties, it was investigated that isolate LH5, a coccus shape bacterium that occurs in pairs and short chains, exhibited the highest potential of probiotic properties when tested under the simulated conditions of poultry digestive tract. It could grow at all tested pH levels (2.0–3.5) and high bile concentration of 1.0% (w/v). Its cell surface hydrophobicity was at the moderate level with the cell surface hydrophobicity value of 57%. The isolate LH5 was susceptible to penicillin,

ampicillin, vancomycin, cefoxitin, chloramphenicol, clindamycin, ceftriaxone, ciprofloxacin, cephalothin and rifampicin, while resisted to three antibiotics, i.e. gentamycin, erythromycin and nalidixic acid. This isolate possessed the antimicrobial activity against two pathogenic bacteria, i.e. *S.* Typhi, a harmful pathogen causing Salmonellosis outbreak in poultry, and *S. aureus*. The isolate LH5 did not show a hemolytic activity on sheep blood agar (gamma-hemolysis). Subsequently, the isolate LH5 was identified as *Enterococcus faecium* with the similarity of 100%. It could also produce GABA of 39.05 mg/L and GABA could be obviously detected on silica gel - coated aluminum sheet with high intensity. In addition, the formulation of probiotic powder was achieved. The survival rate of *E. faecium* LH5 in probiotic powder was high at 95.39 $\pm$ 0.07 and 94.15 $\pm$ 0.19 % after the 12 weeks of storage at 4°C and room temperature (approximately 30°C), respectively, and not significantly different ($p>0.05$) comparing between both temperatures at each week.

Conclusions : *Enterococcus faecium* LH5 bacterium was a potential GABA producing probiotic. Its cells were stable during the formulation process into a powder form and the storage at room temperature. Therefore, it was a promising probiotic strain for further utilization as the feed additive in laying hens. However, a study on the effect of *E. faecium* LH5 supplementation on growth performances and the efficiency of egg production under the challenge of either heat stress or pathogenic infection is necessary to be further investigated before applying as a feed supplement.

Keywords : probiotics ; GABA ; laying hens ; heat stress ; feed supplements

* **Corresponding author. Email** : pairotewong@gmail.com

Introduction

ข้อมูลสถิติจากกระทรวงพาณิชย์รายงานว่าปี พ.ศ. 2563-2567 ประเทศไทยผลิตไข่ไก่ออกสู่ตลาดปีละประมาณ 15,000 ล้านฟอง ซึ่งมาจากการเลี้ยงแบบขังกรง แบบปล่อยในโรงเรือนและแบบปล่อยอิสระ การเลี้ยงไก่ในระดับอุตสาหกรรมทำให้ไก่อยู่อย่างหนาแน่นในโรงเรือน ไก่ได้รับความเครียดจากสภาวะแวดล้อมและโรคระบาดที่ส่งผลต่อการเจริญและผลผลิตต่างๆ ทำให้แก้ปัญหาด้วยการใช้ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) เพื่อเร่งการเจริญเติบโตและรักษาโรค แต่ปัจจุบันหลายประเทศสั่งห้ามหรือควบคุมการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงไก่อย่างเข้มงวด เนื่องจากข้อกังวลด้านผลกระทบที่มีต่อสุขภาพทั้งสัตว์และมนุษย์ ความปลอดภัยทางอาหาร และสิ่งแวดล้อม (Salim *et al*., 2018) ดังนั้น การเสริมอาหารสัตว์ด้วยแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีชีวิต (viable probiotics) แทนการใช้ยาปฏิชีวนะจึงแพร่หลายขึ้น โดยโพรไบโอติกสามารถส่งเสริมให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ลดการติดเชื้อก่อโรค ส่งเสริมภูมิคุ้มกัน ปรับปรุงสัณฐานวิทยาของเซลล์เยื่อบุผิวในลำไส้ เพิ่มการหลั่งของเอนไซม์ย่อยอาหาร สังเคราะห์สารส่งเสริมสุขภาวะให้แก่สัตว์ เช่น กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acids; SCFAs) เอนไซม์ และวิตามิน เป็นต้น และลดอัตราการตาย (Kim *et al*., 2024) ในกรณีการเลี้ยงไก่ไข่ พบว่าโพรไบโอติกช่วยปรับปรุงการผลิตไข่ น้ำหนักไข่ มวลไข่ และอัตราการแลกเนื้อ ช่วยลด

ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดและในไข่แดง และสามารถลดความเครียดจากอากาศร้อน (heat stress) ได้ (Sobczak & Kozlowski, 2015; Mangan & Siwek, 2024) กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ของไทยได้ออกประกาศลงวันที่ 21 พฤศจิกายน พ.ศ.2559 กำหนดให้แบคทีเรียและฟังไจจำนวน 48 ชนิดสามารถใช้เป็นวัตถุเติมในอาหารสัตว์ที่เรียกว่า “สารเสริมชีวนะ” ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ สกุล (genus) *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. และ *Bifidobacterium* sp.

การเลี้ยงไก่ในหลายประเทศ และรวมถึงประเทศไทยมีแนวโน้มเผชิญกับปัญหาที่ไก่เกิดความเครียดอันเนื่องมาจากความร้อน ส่งผลต่ออัตราการเผาผลาญอาหาร ภูมิคุ้มกัน ประสิทธิภาพการวางไข่ และคุณภาพของไข่ที่ลดลง (Gil *et al*., 2023) ไม่เพียงเท่านั้น สภาพอากาศที่ร้อนยังส่งผลในเชิงลบต่อฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึม ระบบต่อมไร้ท่อ ความสมดุลของกรด-เบส สภาวะออกซิเดชั่น ระบบย่อยอาหารและระบบสืบพันธุ์ของไก่ไข่ (Kim & Lee, 2023) กลยุทธต่างๆ ได้ถูกนำมาใช้เพื่อลดผลกระทบดังกล่าวนอกเหนือการเสริมยาปฏิชีวนะลงในอาหารไก่ เช่น การปรับปรุงสภาวะอากาศในพื้นที่เลี้ยง การปรับปรุงสายพันธุ์ไก่ และการจัดการด้านอาหารไก่ เป็นต้น (Elhussiny *et al*., 2021) มีรายงานว่า การเสริมอาหารและน้ำด้วยกรดแกมม่า-อะมิโนบิวทิริกหรือสารกาบ้า (γ-aminobutyric acid, GABA) ช่วยลดผลกระทบจากปัญหาดังกล่าวในไก่ไข่ ทั้งยังช่วยปรับปรุงผลผลิตและคุณภาพของไข่ไก่จากการส่งเสริมให้มีการดูดซึมแคลเซียมและฟอสฟอรัสมากขึ้นและปรับปรุงค่าดัชนีบ่งชี้สุขภาพอื่นๆ เช่น ระดับไขมันในเลือดและภาวะภูมิคุ้มกันของไก่ได้ (Park & Kim, 2015; Elkomy *et al*., 2020) สารกาบ้าเป็นกรดอะมิโนที่ไม่ใช่องค์ประกอบในโครงสร้างโปรตีน ทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งการสื่อประสาท (inhibitory neurotransmission) ทำให้ระบบประสาทผ่อนคลาย ลดความดันเลือด กระตุ้นการดูดซึมแร่ธาตุ กระตุ้นภูมิคุ้มกันและยังส่งผลลดอุณหภูมิแกนกลางของร่างกายได้อีกด้วย นอกจากนี้สารกาบ้ายังมีกลไกเพิ่มระดับเอนไซม์ที่มีบทบาทเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ superoxide dismutase (SOD) และ glutathione peroxidase (GSH-Px) ซึ่งล้วนมีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญและผลผลิตไข่ไก่เช่นกัน (Zhang *et al*., 2012; Zhu *et al*., 2015; Park & Kim, 2015; Jeong *et al*., 2020; Kolupaev *et al*., 2024) กาบ้าพบได้ทั้งในจุลินทรีย์ พืช และสัตว์ แต่สารกาบ้าที่ผลิตในเชิงการค้านิยมผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ (Diana *et al*., 2014; Kim *et al*., 2018) แบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดที่ผลิตสารกาบ้าได้นั้น พบว่ามีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกด้วย เช่น *Levilactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lentilactobacillus buchneri*, *Limosilacobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lacticaseibacillus paracasei* และ *Lactiplantibacillus plantarum* (Devi *et al*., 2023) ซึ่งเมื่อโพรไบโอติกสามารถเจริญยึดครองพื้นที่ (colonization) ในลำไส้จะสามารถผลิตสารกาบ้าและถูกดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงเกิดเป็นประเด็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการคัดเลือกโพรไบโอติกที่จำเพาะต่อไก่ไข่และเป็นชนิดที่สามารถผลิตสารกาบ้าได้ เพื่อการใช้ประโยชน์ต่อยอดเป็นสารเสริมชีวนะส่งเสริมสุขภาพและเพิ่มผลผลิตไก่ไข่ในอนาคต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยที่เผชิญกับปัญหาสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง งานวิจัยที่ศึกษาผลของการเสริมโพรไบโอติกสายพันธุ์ที่ผลิตสารกาบ้าที่มีต่อสมรรถนะการเจริญและผลผลิตไข่ไก่ภายใต้สภาวะความเครียดจากความร้อนยังมีค่อนข้างน้อย พบเพียงการศึกษาของ Zhu *et al*. (2015) ที่เสริมแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. ที่ผลิตสารกาบ้าได้ลงในอาหารช่วยให้ไก่ไข่พันธุ์ Hy-Line brown ที่เลี้ยงภายใต้สภาวะ

อุณหภูมิสูงมีผลผลิตไข่ น้ำหนักไข่ รูปทรงไข่ คุณภาพไข่ ดัชนีบ่งชี้ภาวะเครียดออกซิเดชั่น (oxidative stress) ในเลือด และสมรรถนะการเจริญดีขึ้น งานวิจัยครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากทางเดินอาหารของไก่ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกและสามารถผลิตสารกาบ้าได้ และทดสอบการรอดชีวิตของโพรไบโอติกดังกล่าวภายหลังการขึ้นรูปเป็นผงผลิตภัณฑ์เพื่อการพัฒนาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับสัตว์ปีกโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเลี้ยงไก่ไข่ในอนาคต รองรับระบบการเลี้ยงไก่ทั้งแบบอินทรีย์และทั่วไป

Methodology

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากทางเดินอาหารไก่

ใช้ก้านสำลีปลอดเชื้อกวาดในรูทวารร่วมของไก่ไข่ลึกประมาณ 1-2 นิ้ว แช่สำลีดังกล่าวในอาหารเหลวสูตร de Mann, Rogosa and Sharpe (MRS, Himedia, India) ทันที และบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเชื้อ MRS agar ที่เสริมสารอินดิเคเตอร์ชนิด bromocresol purple ที่ความเข้มข้น 50 ppm คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่ติดสีแกรมบวก (Gram positive) ไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endo-spore) และไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase) เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การทดสอบเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกระดับ in vitro

การย่อยเม็ดเลือดแดง (hemolytic activity) ทดสอบโดยขีดเชื้อลงบนอาหารเพาะเชื้อ blood agar (Biomerieux, France) จากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง สภาวะไร้อากาศ บันทึกลักษณะอาหารรอบโคโลนี ได้แก่ ไม่เกิดการย่อยเม็ดเลือดแดง (γ-hemolysis) มีการย่อยเม็ดเลือดแดงบางส่วน (α-hemolysis) และมีการย่อยเม็ดเลือดแดงอย่างสมบูรณ์ (β-hemolysis)

การทนต่อสภาวะกรดและน้ำดีในทางเดินอาหาร (acid and bile tolerant ability) โดยเตรียมเซลล์แขวนลอยในสารละลาย phosphate-buffered saline (PBS) ความเข้มข้น 50 mM pH 7.4 ให้มีความขุ่นเท่ากับระดับ 0.5 McFarland แล้วเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทดสอบ โดยในการทดสอบความสามารถทนกรดนั้นทำได้โดยการถ่ายหัวเชื้อ 50 µL ลงในอาหารเหลวสูตร MRS ที่ปรับค่า pH เท่ากับ 2.0 2.5 3.0 และ 3.5 ในขณะที่การทดสอบความสามารถทนต่อน้ำดีนั้น ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเหลว MRS เป็น 7.0 และเติมน้ำดี (bovine bile, Sigma) ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 0.3 และ 1.0 (w/v) ทั้งสองการทดสอบบ่มภายใต้สภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0 3 และ 6 เพื่อวัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (Sirisopapong *et al.*, 2023)

ความสามารถของแบคทีเรียในการยึดเกาะบนเซลล์เยื่อบุลำไส้ทำการวัดทางอ้อมจากค่า ความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์ (cell surface hydrophobicity, CSH) ดังวิธีที่ดัดแปลงจาก Rodríguez-Sánchez *et al.* (2021) โดยเตรียมเซลล์แขวนลอยในสารละลาย phosphate-buffered saline (PBS) ความเข้มข้น 50 mM pH 7.4 ปรับให้มีค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.50 ผสมเซลล์แขวนลอยดังกล่าวและสารโทลูอีนในอัตราส่วน 3 และ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 90 วินาที และตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที วัดค่าการ

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของชั้นวัฏภาคน้ำและคำนวณค่า %CSH จากสัดส่วนการลดลงของค่าการดูดกลืนแสง

ความไวต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic susceptibility) ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่คัดเลือกได้มีการทดสอบโดยใช้แผ่น susceptibility antibiotic disc (Oxoid™, Germany) จำนวน 13 ชนิด ซึ่งครอบคลุมกลุ่มยาปฏิชีวนะ (antibiotic class) ทั้ง 10 กลุ่ม (Maasjost *et al*., 2015) โดยวางแผ่นยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดลงบนอาหารแข็งสูตร MRS ที่เกลี่ยเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติกไว้ โดยกำหนดปริมาณเชื้อที่ระดับ 0.5 McFarland จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะไร้อากาศ 24 ชั่วโมง แล้ววัดขนาดของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นรอบแผ่นยาปฏิชีวนะ แปลผลความไวต่อยาปฏิชีวนะโดยเทียบขนาดของบริเวณยับยั้งกับคู่มือ Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) ปี ค.ศ.2017

ความสามารถต้านแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ทดสอบโดยใช้เทคนิค spot on lawn โดยทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhi และ *Staphylococcus aureus* บันทึกผลการทดลองโดยการวัดขนาดบริเวณยับยั้งรอบโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติก

3. การทดสอบความสามารถผลิตสารกาบ้าโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีส่วนผสมของ monosodium glutamate (MSG) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 (w/v) (Han *et al*., 2023) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,000 g เป็นเวลา 5 นาที ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์สารกาบ้าทั้งเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพด้วยวิธีการทางสเปกโตรโฟโตเมทรีและเทคนิค thin layer chromatography (TLC) โดยการวิเคราะห์สารกาบ้าด้วยเทคนิค TLC ใช้แผ่นซิลิกาเจลสำเร็จรูป รุ่น F_{254} (Merck, Germany) เป็นวัฏภาคคงที่ สารละลายผสมของ butanol: acetic acid: deionized water อัตราส่วน 5:2:2 (v/v/v) เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ ทำให้แถบสารปรากฏโดยการจุ่มในสารละลาย ninhydrin ความเข้มข้นร้อยละ 2 (w/v) อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนกระทั่งปรากฏแถบสาร (Phuengjayaem *et al*., 2021) ในขณะที่การวิเคราะห์ปริมาณสารกาบ้าใช้วิธีทางสเปกโทรโฟโตเมทรีที่อ้างอิงจาก Zhang *et al*. (2014) คำนวณปริมาณสารกาบ้าโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกาบ้า (Sigma-Aldrich, U.S.) ที่เตรียมในช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 0 – 100 mg/L

4. การจัดจำแนกแบคทีเรีย

ระบุสปีชีส์ (species) ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกและผลิตสารกาบ้าด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA โดยเตรียมดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป TIANamp Bacteria DNA Kit (TIANGEN, China) จากนั้นเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R (Frank *et al*., 2008) นำไปหาลำดับนิวคลิโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ (ATGC Co., Ltd, Thailand) และวิเคราะห์ผลโดยเทียบกับฐานข้อมูล BLAST ของ the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http:// www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อระบุสปีชีส์ของแบคทีเรีย และศึกษาความสัมพันธ์เชิง

วิวัฒนาการกับแบคทีเรียชนิดอื่น โดยสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 11.0.10 ตามวิธีการของ Neighbour-joining method (Tamura *et al.*, 2021) โดยเลือกใช้ค่า Bootstrap ที่ 1,000

5. การทดสอบขึ้นรูปผงแบคทีเรียโพรไบโอติกและทดสอบการรอดชีวิต

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลตที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลวสูตร MRS ปริมาตร 3.5 ลิตร ใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร (WINPACT, รุ่น FS-06, USA) ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไม่เติมอากาศ กวนที่อัตราเร็ว 50 rpm และไม่ควบคุม pH เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนเซลล์ด้วยการปั่นเหวี่ยง ล้างด้วยสารละลาย NaCl เข้มข้นร้อยละ 0.85 (w/v) 1 ครั้ง จากนั้นนำตะกอนเซลล์ไปผสมกับผงรำข้าวสายพันธุ์หอมมะลิ 105 ปริมาณ 100 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยคำนวณให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 – 10^9 CFU/g แล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Drawell DW-12N, China) เมื่อแห้งแล้ว บดเป็นผงและแบ่งบรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ที่ปิดสนิท แบ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียสโดยประมาณ) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (log CFU/g) จากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS agar โดยเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตก่อนและหลังการทำแห้งและระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ ในแต่ละสัปดาห์ ทั้งนี้ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิเคราะห์ ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นอย่างน้อยร้อยละ 95 ($p<0.05$) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองโดยวิธีของ Duncan ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS V.29

Results

1. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติก

ผลการทดลองคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากรูทวารร่วมของไก่จำนวน 3 ตัวอย่าง พบว่ามีแบคทีเรียจำนวนทั้งสิ้น 42 ไอโซเลต ที่สามารถเจริญและเกิดเป็นโคโลนีสีครีม ลักษณะนูน และผลิตกรดขึ้นมาโดยสังเกตจากสีของอาหารแข็งบริเวณรอบโคโลนีที่เปลี่ยนเป็นสีเหลือง และจากการตรวจสอบเบื้องต้นพบว่าทั้งหมดเป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ ให้ผลการทดสอบเอนไซม์คะตะเลสเป็นลบ และมีรูปร่างกลมจำนวน 5 ไอโซเลต และรูปร่างท่อนจำนวน 37 ไอโซเลต ต่อมาได้ทำการทดสอบศักยภาพในการเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกของทั้ง 42 ไอโซเลต ผลการศึกษาแสดงใน Table 1 และ 2 โดยพบว่ามีแบคทีเรียทั้งสิ้น 28 ไอโซเลตที่ไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง (γ-hemolysis) ในขณะที่มีแบคทีเรียจำนวน 4 และ 10 ไอโซเลตที่พบมีการย่อยเม็ดเลือดแดงทั้งในลักษณะ α-hemolysis และ β-hemolysis ตามลำดับ ดังนั้นจึงได้นำแบคทีเรียทั้ง 28 ไอโซเลตดังกล่าวมาทดสอบในประเด็นอื่นต่อไป โดยการทดสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียภายใต้สภาวะจำลองของกระเพาะอาหารพบว่าแต่ละไอโซเลตสามารถรอดชีวิตและเจริญได้ในระดับที่แตกต่างกัน (Table 1) ทั้งนี้ไอโซเลต LH5 สามารถทนต่อสภาวะกรดได้ดีที่สุด โดยเป็นเพียงไอโซเลตเดียวที่รอดชีวิตและเจริญได้ดีที่ระดับ pH 2.0 ในขณะที่มีแบคทีเรีย 14 ไอโซเลตที่เจริญได้ที่ pH ระดับตั้งแต่ 2.5 ขึ้นไป และไอโซเลตที่เหลือสามารถเจริญได้เมื่อ pH สูงกว่า 3.0 และผลทดสอบการรอดชีวิตในอาหารเหลวที่มีการเติมน้ำดีซึ่งเป็นการจำลองสภาวะของลำไส้เล็กส่วนต้น พบว่ามีเพียงไอโซเลต LH21 ที่ไม่สามารถเจริญได้ในน้ำดีทุกระดับ (Table 1) จากผลการทดสอบทั้งสองนี้ทำให้สามารถสรุปว่าแบคทีเรียไอโซเลต LH5 LH9 LH34 LH37 LH38 LH40 LH42 LH44 LH45 LH49 LH50 และ LH52 มีโอกาสรอดชีวิตจาก

สภาวะรุนแรงในทางเดินอาหารส่วนต้นได้ ต่อมาทุกไอโซเลตได้ถูกประเมินความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ใหญ่โดยทางอ้อมจากค่าความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์แบคทีเรีย ผลการทดสอบแสดงดัง Table 1 เช่นกัน พบว่ามีทั้งสิ้น 13 ไอโซเลตที่มีค่า %CSH ในระดับสูง โดยมีค่าสูงกว่าร้อยละ 70 และมีจำนวน 11 และ 4 ไอโซเลตที่มีค่า %CSH ในช่วงร้อยละ 30-70 (ระดับปานกลาง) และ 0-30 (ระดับต่ำ) ตามลำดับ ตามเกณฑ์การแบ่งระดับของ Boutchard *et al*. (2015) ซึ่งหากพิจารณาแบคทีเรียในกลุ่มที่มีศักยภาพรอดชีวิตจากลำไส้เล็กส่วนต้นแล้ว พบว่ามีเพียงไอโซเลต LH34 และ LH40 เท่านั้นที่แทบไม่มีความสามารถยึดบนผนังลำไส้ใหญ่ได้ และไอโซเลต LH5 ที่สามารถทนต่อสภาวะกรดได้ดีที่สุด มีค่า %CSH ในระดับปานกลาง นอกจากนี้ ผลการทดลองยังพบว่าไอโซเลต LH5 LH50 และ LH52 มีความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ 2 ชนิด ได้แก่ *S.* Typhi และ *S. aureus* โดยสร้างบริเวณยับยั้งขนาดเฉลี่ย 8.33 - 11.67 และ 14.33 – 15.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลตที่เหลือสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้เพียง 1 ชนิด อย่างไรก็ตาม มีแบคทีเรียกรดแลคติกมากถึง 19 ไอโซเลตที่ไม่แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่นำมาทดสอบครั้งนี้ได้ (Table 1)

นอกจากการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกพื้นฐานเหล่านี้แล้ว แบคทีเรียทั้ง 28 ไอโซเลตได้ถูกนำมาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 13 ชนิด โดยบันทึกขนาดบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นรอบแผ่นยาปฏิชีวนะและแปลผลโดยเทียบกับมาตรฐานของ The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ผลการทดสอบแสดงดัง Table 2 ซึ่งพบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมีความไวต่อยาปฏิชีวนะในระดับที่แตกต่างกัน ไอโซเลต LH18 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะมากที่สุดถึง 11 ชนิด รองลงมา ได้แก่ ไอโซเลต LH5 และ LH38 ที่ไวต่อยาปฏิชีวนะ 10 ชนิด ในขณะที่ไอโซเลต LH1 LH7 LH9 LH21 LH23 LH26 LH30 และ LH42 เป็นกลุ่มที่ไวต่อยาปฏิชีวนะน้อยที่สุด (ดื้อยาปฏิชีวนะ) โดยต้านยาปฏิชีวนะมากถึง 7-9 ชนิด ทั้งนี้ยา vancomycin เป็นยาปฏิชีวนะที่พบว่ามีเชื้อดื้อยามากที่สุดถึง 26 ไอโซเลต ส่วนยา ampicillin, cephalothin และ chloramphenicol มีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกได้ถึง 27 ไอโซเลต หากพิจารณาจากผลการทดสอบทั้งหมดดังที่รายงานไว้ข้างต้นพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่มีศักยภาพนำมาประยุกต์ใช้เป็นโพรไบโอติกในสัตว์ได้ ได้แก่ LH5 LH50 และ LH52 เนื่องจากมีแนวโน้มรอดชีวิตจากสภาวะความเป็นกรดและน้ำดีระดับสูงในทางเดินอาหารส่วนต้นของไก่ไข่ได้ดีที่สุด พื้นผิวเซลล์แบคทีเรียแสดงคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำซึ่งส่งเสริมให้เซลล์ยึดเกาะและเจริญบนผนังลำไส้ได้ดี ประกอบกับมีความสามารถต่อต้านแบคทีเรียก่อโรค *S.* Typhi และ *S. aureus* ได้ อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะชี้ให้เห็นว่า LH50 และ LH52 ต้านยาปฏิชีวนะมากถึง 6 ชนิด ดังนั้นไอโซเลต LH5 จึงเป็นเพียงไอโซเลตเดียวมีความน่าสนใจที่จะถูกคัดเลือกไปประยุกต์ใช้เป็นสารเสริมชีวนะกลุ่มโพรไบโอติกในการเลี้ยงไก่ไข่ต่อไป

Table 1 The results of probiotic property tests in the lactic acid bacteria isolated from the cloaca of laying hens

Isolates	Growth under the acidic condition				Growth under the presence of bile		% CSH	Antimicrobial activity (mm)		
	pH2	pH2.5	pH3	pH3.5	0.3%	1.0%		*E. coli*	*S.* Typhi	*S. aureus*
LH1	-	-	++	++	++	++	74.32	-	-	-
LH2	-	-	-	++	++	++	54.58	-	-	-
LH3	-	-	-	++	++	++	50.16	-	-	-
LH4	-	-	-	++	++	++	44.42	-	-	-
LH5	++	++	++	++	++	++	56.68	-	11.67	14.33
LH6	-	-	-	++	++	++	16.42	-	-	-
LH7	-	-	-	++	++	++	52.84	-	-	11.00
LH8	-	-	-	++	++	++	18.44	-	-	11.67
LH9	-	++	++	++	++	++	48.11	-	-	10.00
LH10	-	-	+	++	++	++	55.38	-	-	14.67
LH11	-	-	++	++	++	++	68.30	-	9.33	-
LH18	-	-	++	++	++	++	52.66	-	-	-
LH21	-	+	+	+	-	-	88.78	-	-	-
LH23	-	-	++	++	++	++	90.16	-	-	-
LH25	-	-	++	++	++	++	89.12	-	-	-
LH26	-	-	++	++	++	++	82.60	-	-	-
LH30	-	+	-	-	++	++	92.95	-	-	-
LH33	-	-	++	++	++	++	85.99	9.33	-	-
LH34	-	++	++	++	++	++	2.66	-	-	-
LH37	-	++	++	++	++	++	68.40	-	-	-
LH38	-	++	++	++	++	++	67.21	-	-	-
LH40	-	++	-	++	+	++	0.00	-	-	-
LH42	-	++	++	++	++	++	76.42	-	-	-
LH44	-	++	++	+	++	++	74.94	-	-	-
LH45	-	++	++	+	++	++	71.02	-	-	-
LH49	-	++	++	+	++	++	82.24	-	-	-
LH50	-	++	++	+	++	++	75.56	-	8.33	14.67
LH52	-	++	++	+	++	++	83.10	-	10.00	15.00

Note: "-" = no growth, "+" = growth with A_{600} < 1.000, "++" = growth with A_{600} > 1.000

2. การทดสอบความสามารถผลิตสารกาบ้าโดยโพรไบโอติกที่คัดเลือกได้และการระบุสปีชีส์

แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต LH5 ได้ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตสารกาบ้า ทั้งนี้มีการทดสอบความสามารถดังกล่าวของไอโซเลต LH50 และ LH52 ด้วยเพื่อการเปรียบเทียบ ผลการทดสอบพบว่าไอโซเลต LH5 ผลิตสารกาบ้าได้ในปริมาณ 39.05 ± 0.003 mg/L และตรวจพบได้บนแผ่นซิลิกาเจลโดยปรากฏแถบสารกาบ้าขึ้นเหนือแถบของสาร MSG (Figure 1) อย่างไรก็ตาม พบว่าไอโซเลต LH50 และ LH52 ผลิตสารกาบ้าได้เช่นกัน โดยผลิตในปริมาณ 2.14 ± 0.003 และ 4.52 ± 0.004 mg/L ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าผลผลิตโดยไอโซเลต LH5 อย่างชัดเจน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ ไอโซเลต LH5 จึงมีความเหมาะสมที่ถูกคัดเลือกนำไปประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมกลุ่มโพรไบโอติกที่มีความสามารถผลิตสารกาบ้า เพื่อเป้าหมายในการแก้ไขปัญหาการเลี้ยงไก่ไข่ดังที่ระบุไว้แล้ว ไอโซเลต LH5 เป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก โคโลนีสีครีม รูปร่างกลมนูน (Figure 2A) เจริญได้ในสภาวะที่ไร้อากาศ และรูปร่างของเซลล์เมื่อศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าเป็นทรงกลม อยู่เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายสั้น (Figure 2B) และเมื่อศึกษาลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน 16S rRNA ทำให้สามารถระบุสปีชีส์ได้เป็นแบคทีเรีย *Enterococcus faecium* และแผนภาพ dendrogram ที่แสดงการจัดกลุ่มคลัสเตอร์แบคทีเรียจากฐานข้อมูล GenBank และไอโซเลต LH5 ในรูปแบบ phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่า *E. faecium* LH5 มีความสัมพันธ์อยู่ในกลุ่มของ *E. faecium* (Figure 2C)

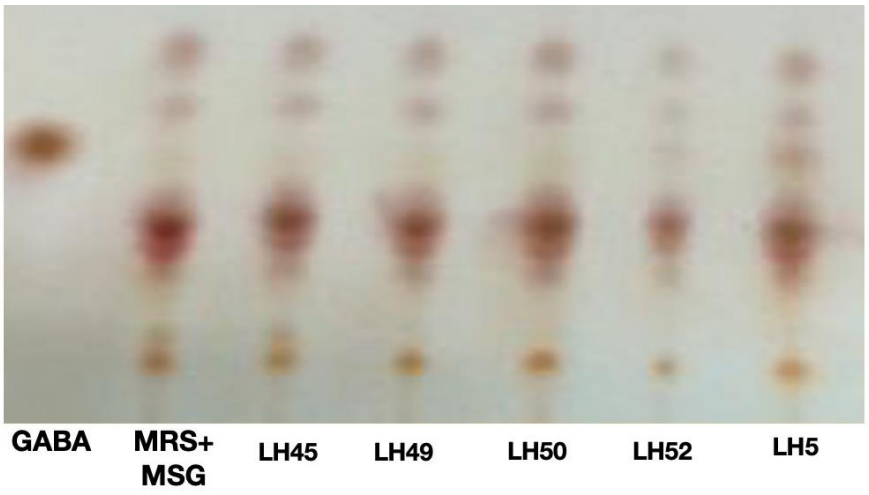

Figure 1 The analysis of γ-aminobutyric acid (GABA) production by the isolated lactic acid bacteria from the cloaca of laying hens using thin layer chromatography

Table 2 The antibiotic susceptibility of the lactic acid bacteria isolated from the cloaca of laying hens

Isolates	P	AM	KF	VA	CRO	FOX	C	E	CC	GM	CIP	NA	RD
LH1	R	S	R	S	R	R	S	MS	R	R	R	R	S
LH2	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	MS	R
LH3	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R
LH4	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R
LH5	MS	S	S	S	MS	MS	S	R	MS	R	MS	R	S
LH6	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	MS	MS
LH7	R	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R
LH8	MS	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	MS	R
LH9	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S	MS	R
LH10	MS	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	R	S
LH11	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R
LH18	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	MS	R	S
LH21	MS	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
LH23	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S
LH25	MS	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	S
LH26	MS	S	MS	R	MS	R	S	R	R	R	R	R	S
LH30	MS	S	MS	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
LH33	S	S	S	R	MS	R	S	R	S	R	MS	R	S
LH34	S	S	S	R	S	MS	S	MS	R	R	MS	R	S
LH37	S	S	S	R	S	MS	R	MS	S	R	MS	R	S
LH38	S	S	S	R	S	MS	S	MS	MS	R	MS	R	S
LH40	MS	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	S
LH42	R	MS	MS	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S
LH44	MS	S	S	R	S	R	S	R	MS	R	MS	R	S
LH45	MS	S	S	R	S	R	S	MS	R	R	MS	R	S
LH49	MS	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	S
LH50	MS	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	S
LH52	MS	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	S

Note: "R", "MS" and "S" represent resistant, intermediate and susceptible, respectively. The list of antibiotics: P = Penicillin (10 µg); AMP = Ampicillin (10 µg); VA = Vancomycin (30 µg); FOX = Cefoxitin (30 µg); C = Chloramphenicol (30 µg); CC = Clindamycin (2 µg); CRO = Ceftriaxone (30 µg); GM = Gentamicin (10 µg); CIP = Ciprofloxacin (5 µg); KF = Cephalothin (30 µg); E = Erythromycin (15 µg); RD = Rifampicin (5 µg); NA = Nalidixic acid (30 µg)

3. การทดสอบขึ้นรูปผงเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกและทดสอบการรอดชีวิต

มวลเซลล์สดของ *E. faecium* LH5 และที่ผ่านการทำแห้งแสดงดัง Figure 3 โดยพบว่าเซลล์มีการรอดชีวิตภายหลังการทำแห้งร้อยละ 86.54 (คำนวณจากหน่วย log CFU) และมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นในผงโพรไบโอติก 9.17 log CFU/g ต่อมาเมื่อเก็บรักษาผงโพรไบโอติกภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้องพบว่าเซลล์ค่อนข้างมีความเสถียรและรอดชีวิตสูง มีการลดลงของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเพียงเล็กน้อยตลอดการเก็บรักษาเป็นเวลา 3 เดือน โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองมีการลดลงในระดับไม่เกิน 0.5 log CFU ดังผลการทดลองใน Table 3 คิดเป็นร้อยละการรอดชีวิต 95.39 $\pm$ 0.07 และ 94.15 $\pm$ 0.19 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์เริ่มต้นในผงโพรไบโอติก อีกทั้งแม้พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในผงโพรไบโอติกแต่ละสัปดาห์ที่เก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสสูงกว่าผงโพรไบโอติกที่เก็บในอุณหภูมิห้อง แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

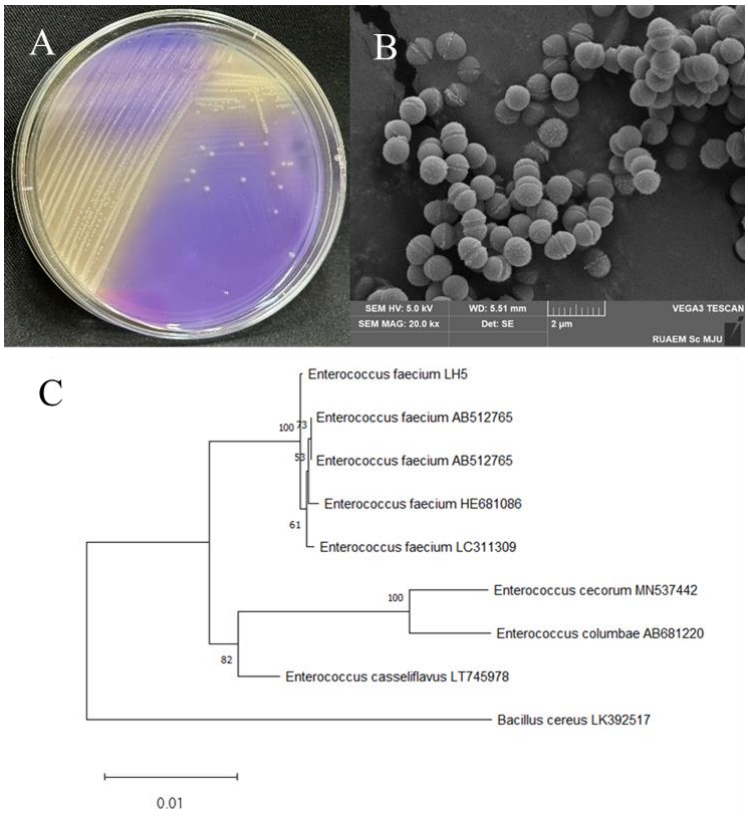

Figure 2 The morphology of *Enterococcus faecium* LH5 colony on MRS agar (A) and its cell morphology studied under the scanning electron microscope (B) and the phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the relationship of *E. faecium* LH5 with strains of closely related species. Confidence values on the branches were obtained for 1,000 bootstrap replicates with MEGA 11.0.10 software (C)

Figure 3 The biomass of *Enterococcus faecium* LH5 probiotic; fresh (A) and powder (B) form

Table 4 The viable cell count of probiotic *E. faecium* LH5 in the powder form after storage at 4°C and the room temperature (30 °C) for 12 weeks

Storage time (week)	Viable cell count (log CFU/g)	
	4°C	Room temperature (30°C)
0	8.89 ± 0.05^{f}	8.89 ± 0.02^{d}
1	8.76 ± 0.60^{ef}	8.70 ± 0.01^{cd}
2	8.75 ± 0.01^{e}	8.67 ± 0.01^{bcd}
3	8.63 ± 0.02^{cd}	8.56 ± 0.02^{abc}
4	8.67 ± 0.06^{de}	8.51 ± 0.04^{abc}
5	8.59 ± 0.01^{bcde}	8.51 ± 0.03^{abc}
6	8.54 ± 0.06^{abcd}	8.40 ± 0.13^{ab}
7	8.41 ± 0.10^{ab}	8.42 ± 0.16^{abc}
8	8.50 ± 0.03^{abcd}	8.40 ± 0.12^{ab}
9	8.39 ± 0.09^{a}	8.46 ± 0.12^{abc}
10	8.40 ± 0.10^{a}	8.34 ± 0.07^{a}
11	8.46 ± 0.04^{abc}	8.37 ± 0.11^{a}
12	8.48 ± 0.07^{abcd}	8.39 ± 0.19^{ab}

Note: Different superscript letters in each column represent significant difference at $p<0.05$. The means between 2 treatments of temperature at each week are not significantly different ($p>0.05$) by t-test.

Discussion

คุณสมบัติพื้นฐานของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่จะนำมาใช้เป็นสารเสริมชีวนะสำหรับไก่คือจำเป็นต้องรอดชีวิตภายใต้สภาวะกรดในกระเพาะอาหารและน้ำดีในลำไส้เล็กส่วนต้น ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกหลายไอโซเลตที่มีคุณสมบัติพื้นฐานดังกล่าว ทั้งนี้แบคทีเรียที่ทนกรดมีกลไกที่สำคัญผ่านกลุ่มยีนที่ควบคุมการขับโปรตรอน (H^+) และไอออนบวกออกจากเซลล์อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งมีกลุ่มยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์และเผาผลาญกรดอะมิโนได้เป็นสารเมแทบอไลท์ที่มีฤทธิ์เป็นด่างเพื่อปรับสภาวะความเป็นกรด-ด่างโดยรอบเซลล์ให้เป็นกลาง (Chen *et al.*, 2024) ทั้งนี้ทางเดินอาหารส่วนต้นของไก่ที่ต่อจากหลอดอาหารคือถุงพักอาหาร (crop) กระเพาะแท้ (proventriculus) และกึ๋น (gizzard) ซึ่งล้วนมีความเป็นกรดที่ระดับต่างกัน โดยถุงพักอาหารของไก่ไข่มี pH ตั้งแต่ 4.1 – 6.8 ขึ้นกับสายพันธุ์ (Kierończyk *et al*., 2016; Hervo *et al*., 2024) กระเพาะแท้และกึ๋นมี pH โดยประมาณ 4.2 – 5.27 และ 1.2 – 4.0 ตามลำดับ (Morgan *et al*., 2014; Recoules *et al*., 2019) ส่วนน้ำดีของไก่ประกอบไปด้วยกรดน้ำดี (bile acids) และเกลือน้ำดี (bile salts) ซึ่งมีการคอนจูเกต (conjugation) กับกรดอะมิโน taurine เป็นส่วนใหญ่ และน้ำดีมีปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid) เป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 19.8 โดยน้ำหนักแห้ง (Tancharoenrat *et al*., 2022) นอกเหนือจากบทบาทช่วยส่งเสริมการย่อยไขมันในทางเดินอาหารแล้ว เกลือน้ำดียังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อนหลายชนิด แต่แบคทีเรียโพรไบโอติกและแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด เช่น *Salmonella* sp. และ *Shigella* sp. ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคสำคัญในสัตว์ปีกมีกลไกทางชีวภาพในการต้านฤทธิ์ของเกลือน้ำดีได้ (Gunn, 2000) ส่วนในกรณีของโพรไบโอติกกลุ่ม lactobacilli และ bifidobacteria พบว่าใช้กลไกการผลิตเอนไซม์กลุ่ม bile salt hydrolase กลไกการขับเกลือน้ำดีออกจากเซลล์ (active efflux of bile acids/salts) และการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ (Ruiz *et al*., 2013) โดยทั่วไปแล้ว การคัดเลือกโพรไบโอติกที่ทนน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.15 – 0.30 (w/v) ถือว่าเพียงพอและเป็นที่ยอมรับในการนำมาใช้เสริมในอาหารสัตว์ปีก (Xu *et al*., 2023) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบถึงระดับความเข้มข้นร้อยละ 3.0 (w/v) เนื่องจากปัจจุบันได้มีงานวิจัยที่พบว่าการเสริมกรดน้ำดีเพิ่มในอาหารเลี้ยงไก่ไข่ช่วยปรับปรุงสมรรถนะการเจริญ เมแทบอลิซึมของไขมัน และสมดุลจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารไก่ไข่ได้ (Yang *et al*., 2022) ดังนั้น แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีโอกาสรอดชีวิตจากลำไส้เล็กได้มากขึ้นในภาวะที่มีน้ำดีความเข้มข้นสูงกว่าที่พบในทางเดินอาหารไก่ไข่ทั่วไป เพื่อเคลื่อนย้ายต่อไปเจริญยึดครอง (colonization) ที่ผนังลำไส้ใหญ่

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากทางเดินอาหารไก่ได้ถูกประเมินความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ใหญ่โดยทางอ้อมจากค่าความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งโดยทั่วไปคือบริเวณที่เป็นองค์ประกอบไขมันของส่วนห่อหุ้มเซลล์ หากมีมากจะทำให้มีค่าความไม่ชอบน้ำของพื้นผิวเซลล์สูง ค่านี้สัมพันธ์กับแรง Van der Waals และแรงไฟฟ้าสถิตย์ที่ทำให้เซลล์มีความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ (adhesion ability) สูง นอกจากนี้ยังมักมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความสามารถของเซลล์ในการจับกันเอง (auto-aggregation) และการจับกันระหว่างแบคทีเรียต่างชนิด (coaggregation) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีของโพรไบโอติก (Chantanawilas *et al*., 2024) ทั้งนี้ลำไส้ของสัตว์ปีกมีความยาวที่สั้นกว่าของมนุษย์ อาหารไหลผ่านใช้เวลาเพียง 2 - 3.5 ชั่วโมง ดังนั้นโพรไบโอติกต้องมีความสามารถยึดเกาะผนังลำไส้ได้ดีเพื่อการเจริญยึดครองและป้องกันการยึดครองพื้นผิวลำไส้โดยแบคทีเรียก่อโรค รายงานของ Ben-Miled *et al*. (2023)

พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีค่า %CSH สูงมักเป็นแบคทีเรียจากสกุล *Lactobacillus* sp. และ *Bifidobacterium* sp. ในขณะที่กลุ่มที่มีค่าปานกลางและต่ำอยู่ในสกุล *Enterococcus* sp., *Leuconostoc* sp. และ *Pediococcus* sp. และจากการรายงานค่า %CSH ของแบคทีเรีย *Salmonella* sp. จำนวนกว่า 22 serotypes ที่ก่อโรคทางเดินอาหารได้ทั้งในคนและสัตว์ปีกโดย Abdallah *et al*. (2014) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.29 $\pm$ 0.56 ถึง 29.55 $\pm$ 0.1 ซึ่งต่ำกว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่คัดแยกได้ในการศึกษานี้ ดังนั้น จึงคาดว่าแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลตซึ่งมีค่า %CSH ระดับปานกลางและสูงเหล่านี้จะมีความสามารถในการแข่งขันเจริญยึดครองพื้นที่บนลำไส้ได้ดีกว่า *Salmonella* sp. ซึ่งแบคทีเรียกลุ่ม *Salmonella* sp. เป็นเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารรุนแรงในสัตว์ปีกคือโรค Salmonellosis ซึ่งมีอาการหลักคือท้องร่วง ซึม ไม่กินอาหารและตาย มักพบว่ามีปนเปื้อนของเชื้อในเนื้อไก่สดและไข่ไก่ซึ่งก่อโรคต่อไปในผู้บริโภคได้ มีรายงานว่าลูกไก่อายุ 1 วันสามารถเกิดการติดเชื้อ *S*. Enteritidis ได้แม้ได้รับเพียง 1-5 เซลล์ (Shaji *et al*., 2023) จึงต้องมีมาตรการเฝ้าระวังการแพร่ระบาดในฟาร์มสัตว์ปีกทั่วโลกอย่างเข้มงวด

ประเด็นความสามารถในการต้านยาปฏิชีวนะของโพรไบโอติกยังคงเป็นที่ถกเถียงอย่างกว้างขวาง เนื่องจากนักวิจัยบางกลุ่มมีความเห็นว่าโพรไบโอติกควรเป็นสายพันธุ์ที่สามารถต้านยาปฏิชีวนะได้หลากหลายเนื่องจากสามารถรอดชีวิตได้มากกว่าหากผู้บริโภค (คนและสัตว์) ต้องมีการรักษาอาการเจ็บป่วยด้วยยาปฏิชีวนะ แต่นักวิจัยกลุ่มที่คัดค้านกังวลถึงโอกาสที่อาจมีการส่งถ่ายยีนต้านยาปฏิชีวนะเหล่านี้จากโพรไบโอติกไปยังจุลินทรีย์ก่อโรคต่างๆ ในทางเดินอาหารทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้กลายเป็นสายพันธุ์ดื้อยาและยากต่อการรักษา (Sharma *et al*., 2017) งานวิจัยในครั้งนี้มีความกังวลถึงความเสี่ยงของปัญหาการดื้อยาของจุลินทรีย์ก่อโรคเช่นกัน จึงสนับสนุนการใช้โพรไบโอติกชนิดที่ไวต่อยาปฏิชีวนะในการพัฒนาเป็นอาหารเสริมในไก่ไข่ครั้งนี้

แบคทีเรียไอโซเลต LH5 ที่ถูกคัดเลือกเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าถูกระบุสปีส์เป็น *Enterococcus faecium* ซึ่งเป็นหนึ่งในสมาชิกของแบคทีเรียกลุ่ม enterococci ที่ถูกรายงานว่ามีคุณสมบัติโพรไบโอติกมากว่า 20 ปีและถูกใช้เชิงการค้าเพื่อเป็นอาหารเสริมในสัตว์โดยปราศจากผลข้างเคียง เช่น *E. faecium* SF68® และ *E. faecium* strain11181 ซึ่งได้รับอนุญาตจาก the European Food Safety Authority (EFSA) ให้ใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อใช้ขุนและเพิ่มสมรรถนะการเจริญของสัตว์หลายชนิด (Zommiti *et al*., 2022) สกุล *Enterococcus* sp. ยังถูกพบเป็นสัดส่วนสูงสุดในการศึกษาคัดแยกแบคทีเรียโพรไบโอติกจากลำไส้ไก่เนื้อและไก่ไข่ โดยพบในสัดส่วนร้อยละ 76.2 รองลงมาคือ *Lactococcus* sp. และ *Streptococcus* sp. และในสกุล *Enterococcus* sp. นี้พบชนิด *E. faecium*, *E. faecalis* และ *E. avium* เป็นสัดส่วนสูงสุดคือร้อยละ 42.8 12.0 และ 9.5 ตามลำดับ (Carvajal *et al*., 2023) ในกรณีของการเลี้ยงไก่ไข่นั้น มีหลายงานวิจัยที่ใช้โพรไบโอติกชนิด *E. faecium* เพื่อปรับปรุงคุณภาพการเลี้ยงทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ ไม่ว่าจะเป็น *E. faecium* DSM7134 ที่ช่วยเพิ่มผลผลิตไข่ ความหนาเปลือกไข่ และการย่อยได้ของสารอาหาร และยังช่วยลดจำนวนแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในไก่พันธุ์ ISA brown (Park *et al*., 2016) นอกจากนี้ *E. faecium* ยังช่วยลดระดับไตรกลีเซอไรด์และภาวะความเครียดออกซิเดชั่นในเลือด เพิ่มระดับ IgG ลดการติดเชื้อ *S*. Enteritidis ปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารโดยลดแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroides*, *Desulfovibrio*, *Synergistes* และ *Sutterella* แต่เพิ่มแบคทีเรียกลุ่ม *Barnesiella*, *Butyricimonas* และ *Biophila* (Huang *et al*., 2022) ผลการศึกษาเหล่านี้ล้วนยืนยันศักยภาพ

ของ *E. faecium* ในการเป็นโพรไบโอติกได้ สำหรับประเทศไทยนั้น *E. faecium* ได้ถูกระบุไว้ในรายชื่อโพรไบโอติกสำหรับใช้ในอาหารคน (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง “การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร” ลงวันที่ 27 มิถุนายน 2554) แต่กรณีอาหารสัตว์ ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ลงวันที่ 21 พฤศจิกายน 2559 เรื่อง “กำหนดวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ปริมาณการใช้ และเงื่อนไขในการห้ามผลิต นำเข้า หรือขายอาหารสัตว์” ได้ระบุเป็นชนิด *Streptococcus faecium* ไว้ ซึ่งเป็นชื่อชนิดเดิมของ *E. faecium* (Zhou *et al*., 2020) ข้อมูลเหล่านี้ช่วยสร้างความมั่นใจว่า *E. faecium* LH5 ที่คัดเลือกได้นี้มีโอกาสและศักยภาพนำไปใช้ประโยชน์เป็นโพรไบโอติกในไก่ไข่ได้ อีกทั้งการเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกจากทางเดินอาหารไก่จึงมีโอกาสสูงที่สามารถรอดชีวิตและเจริญภายใต้สภาวะทางเดินอาหารของไก่ได้ (Gibson *et al*., 2004; Carvajal *et al*., 2023) เช่นเดียวกับรายงานของ Khalifa & Ibrahim (2023) ซึ่งคัดแยกโพรไบโอติก *E. faecium* CF2 จากมูลไก่แล้วนำกลับไปเสริมในอาหารเลี้ยงไก่พันธุ์ white leghorns แล้วพบว่าช่วยปรับปรุงน้ำหนักตัว ลดการตาย ลดการติดเชื้อ *S.* Enterica ในม้ามและต่อมไทมัส และตรวจพบสาร proinflammatory cytokine ชนิด interleukin 1 β ในลำไส้ลดลง

ผลผลิตสารกาบ้าโดย *Enterococcus faecium* LH5 ที่ได้ยังอยู่ในระดับต่ำเมื่อเทียบกับแบคทีเรียชนิดอื่นที่เคยมีรายงานก่อนหน้านี้ อย่างไรก็ตาม สภาวะดังกล่าวอาจไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตสารกาบ้า ทั้งนี้กลยุทธเพื่อเพิ่มระดับการสังเคราะห์สารกาบ้าโดยแบคทีเรียอาจทำได้โดยการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ glutamic acid decarboxylase (GAD) ไม่ว่าจะเป็นยีน *gadA* และ *gadB* และการผลิต glutamate/GABA antiporter GadC โดยยีน *gadC* ซึ่งทำหน้าที่แลกเปลี่ยน GABA และ glutamate โดยนำ GABA ที่สังเคราะห์ในเซลล์ออกนอกเซลล์ ในขณะเดียวกันนำ glutamate จากนอกเซลล์เข้ามาในเซลล์ (Yao *et al*., 2023; Tan *et al*., 2024) การดัดแปลงพันธุกรรมหรือการหาสภาวะที่เหมาะสมทั้งสารอาหารและสิ่งแวดล้อมให้เหมาะต่อการแสดงออกของยีนเหล่านี้อาจเป็นกลยุทธที่มีประสิทธิภาพในกรณีเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อผลิตสารกาบ้า แต่กลยุทธ์เหล่านี้อาจไม่เหมาะสมนักเมื่อนำแบคทีเรียดังกล่าวเป็นสารเสริมชีวนะในสัตว์และมนุษย์ อย่างไรก็ตาม *E. faecium* ที่อาศัยในทางเดินอาหารอาจถูกกระตุ้นให้สังเคราะห์สารกาบ้าเพิ่มขึ้นได้ผ่านกลไกระบบ quorum sensing (QS) ซึ่งเป็นการสื่อสารผ่านสารเมแทบอไลท์ของประชากรจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารไก่ ดังเช่นที่มีศึกษาโดยงานวิจัยของ Tan *et al*. (2024) จากรายงานที่ผ่านมา *E. faecium* BS5 ซึ่งถูกคัดแยกจากผลิตภัณฑ์นมของประเทศอินเดียได้ถูกรายงานว่ามีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกและผลิตสารกาบ้าได้ (BS *et al*., 2021) ในขณะที่ *E. avium* JS-N6B4 ที่แยกจากแมลงที่เป็นอาหารมนุษย์ (Jo *et al*., 2019) และ *E. avium* GL1 ที่คัดแยกได้จากเครื่องดื่ม Daqu ของประเทศจีน (Li *et al*., 2024) เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตสารกาบ้าได้ในปริมาณสูงมากถึง 13.68 และ 206 g/L ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นที่มีศักยภาพผลิตสารกาบ้าได้ในปริมาณสูงและผ่านการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกเช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น *Weisella confusa* G2 (246.2 mg/L) แยกได้จากถั่วเขียวหมักของประเทศอินเดีย (Devi *et al*., 2023) และ *Levilactobacillus brevis* ในปริมาณ 4 -8 g/L ด้วย conversion ratio สูงถึงร้อยละ 89 (Casertano *et al*., 2023) แต่อย่างไรก็ตาม ข้อได้เปรียบของ *E. faecium* LH5 จากงานครั้งนี้ในการประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมในไก่คือเป็นโพรไบโอติกที่มีโอกาสรอดชีวิตสูงและเจริญในทางเดินอาหารของไก่ควบคู่กับการการผลิตสารกาบ้าดังที่ได้กล่าวไว้แล้ว

อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า *E. faecium* แบคทีเรียที่ทนต่อความร้อนได้ดีโดยสามารถทนอุณหภูมิการพาสเจอไรซ์ที่ 62.5 องศาเซลเซียสได้นานถึง 20 นาที (Martínez *et al*., 2003; Špelina *et al*., 2007) จึงอาจเป็นเหตุผลช่วยให้อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ที่สูงเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ประกอบกับ *E. faecium* เป็นแบคทีเรียกลุ่ม facultative anaerobe ซึ่งแม้เจริญได้ดีในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน แต่ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนเล็กน้อยก็ยังสามารถเจริญได้แต่ไม่สูงมาก (Kalode & Patil, 2023) ออกซิเจนเป็นสาเหตุการตายของโพรไบโอติกหลายชนิดด้วย เพราะออกซิเจนเป็นพิษต่อเซลล์แบคทีเรียกลุ่ม obligate anaerobe ซึ่งไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญโดยทำให้เกิดการสะสมของ O_2^- OH^- และ H_2O_2 ขึ้นภายในเซลล์แต่ไม่มีกลไกที่มีประสิทธิภาพในการกำจัด reactive oxygen species เหล่านี้ นอกจากนี้ยังพบว่า H_2O_2 ขัดขวางกิจกรรมของ fructose-6-phosphofructoketolase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของน้ำตาล (Cruz *et al*., 2009) ข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่านอกจาก *E. faecium* LH5 มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกที่ผลิตสารกาบ้าได้แล้วยังมีความเป็นไปได้ในการขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ผงโพรไบโอติกที่มีความคงตัวสูง ความคงตัวของโพรไบโอติก *E. faecium* LH5 นี้อาจเป็นผลเชิงบวกมาจากรำข้าวที่ผสมเป็นสารจับตัว (carrier) ในการทำแห้งด้วย เนื่องจากรำข้าวมีสารพฤกษเคมี (phytochemicals) หลายชนิดที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidation activity) ไม่ว่าจะเป็นวิตามิน E สาร tocotriennols สาร γ-oryzanol และสารประกอบฟีนอลิก เช่น coumaric acid, ferulic acid และ syringic acid เป็นต้น (Gul *et al*., 2015) และที่สำคัญที่สุด ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกเมื่อนำไปใช้งานผสมในอาหารสัตว์แล้ว ต้องมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรวมกันไม่น้อยกว่า 10^5 CFU ต่ออาหารสัตว์ 1 กิโลกรัม ตามข้อกำหนดของประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ลงวันที่ 21 พฤศจิกายน 2559 เรื่อง “กำหนดวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ปริมาณการใช้ และเงื่อนไขในการห้ามผลิต นำเข้า หรือขายอาหารสัตว์”

Conclusions

สามารถคัดเลือกแบคทีเรีย *Enterococcus faecium* LH5 ได้จากระบบทางเดินอาหารไก่ ซึ่งแบคทีเรียไอโซเลตนี้มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกและยังมีความสามารถผลิตสารกาบ้าได้ นอกจากนี้ *E. faecium* LH5 มีความเสถียรต่อกระบวนการทำแห้งด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและอุณหภูมิการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง โดยรอดชีวิตได้ประมาณร้อยละ 95 หลังเก็บรักษาเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ดังนั้น ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรีย *E. faecium* LH5 มีความเป็นไปได้ในการขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวนะกลุ่มโพรไบโอติกสำหรับเสริมในอาหารไก่ไข่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงไก่ไข่ของประเทศไทยซึ่งเผชิญกับปัญหาอากาศร้อน อย่างไรก็ตาม ยังมีความจำเป็นทดสอบผลของการเสริม *E. faecium* LH5 ต่อสมรรถนะการเจริญและคุณภาพผลผลิตไข่ไก่ต่อไป

Acknowledgments

ขอบคุณการสนับสนุนอุปกรณ์ และสถานที่ดำเนินงานวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

References

Abdallah, F. B., Lagha, R., Khaled, S., Kallel, H., & Gharbi, J. (2014). Detection of cell surface hydrophobicity, biofilm and fimbirae genes in *Salmonella* isolated from Tunisian clinical and poultry meat. *Iranian Journal of Public Health*, *43*(4), 423.

Ben-Miled, H., Benoit-Biancamano, M.-O., Ben-Mahrez, K., & Réjiba, S. (2023). Alpha-amylase and alphaglucosidase inhibitory properties, beta-galactosidase activity, and probiotic potential of lactic acid bacteria and bifidobacteria from *Apis mellifera intermissa* and its products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *39*(8), 205.

Bouchard, D. S., Seridan, B., Saraoui, T., Rault, L., Germon, P., Gonzalez-Moreno, C., Nader-Macias, F. M., Baud, D., François, P., & Chuat, V. (2015). Lactic acid bacteria isolated from bovine mammary microbiota: potential allies against bovine mastitis. *PloS one*, *10*(12), e0144831.

Bs, S., Thankappan, B., Mahendran, R., Muthusamy, G., Femil Selta, D. R., & Angayarkanni, J. (2021). Evaluation of GABA production and probiotic activities of *Enterococcus faecium* BS5. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *13,* 993-1004.

Carvajal, E., Contreras, S., Díaz, W., Martinez-Bello, D., McCown, M., Ardila, Y., & Vásquez, M. C. (2023). *Enterococcus* isolated from poultry intestine for potential probiotic use. *Veterinary World*, *16*(8), 1605.

Casertano, M., Fryganas, C., Valentino, V., Troise, A.D., Vitaglione, P., Fogliano, V., & Ercolini, D. (2024). Gut production of GABA by a probiotic formula: an *in vitro* study. *Beneficial Microbes*, *15*(1), 67-81.

Chantanawilas, P., Pahumunto, N., & Teanpaisan, R. (2024). Aggregation and adhesion ability of various probiotic strains and *Candida* species: an *in vitro* study. *Journal of Dental Sciences*,*19*(4), 2163-2171.

Chen, Z., Niu, C., Wei, L., Huang, Z., & Ran, S. (2024). Genome-wide analysis of acid tolerance genes of *Enterococcus faecalis* with RNA-seq and Tn-seq. *BMC Genomics*, *25*, 261.

Cruz, A. G., Antunes, A. E., Sousa, A. L. O., Faria, J. A., & Saad, S. M. (2009). Ice-cream as a probiotic food carrier. *Food Research International*, *42*(9), 1233-1239.

Devi, P. B., Rajapuram, D. R., Jayamanohar, J., Verma, M., Kavitake, D., Avany, B. A. M., Rani, P. U., Ravi, R., & Shetty, P. H. (2023). Gamma-aminobutyric acid (GABA) production by potential probiotic strains of indigenous fermented foods origin and RSM based production optimization. *LWT*, *176,* 114511.

Diana, M., Quílez, J., & Rafecas, M. (2014). Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. *Journal of Functional Foods*, *10*, 407-420.

Elkomy, A., Zahra, A.E., Belih, S., Shaheen, Y., & Aboubakr, M. (2020). Effect of drinking water supplemented with gamma-aminobutyric acid (GABA) on laying performance and egg quality parameters in laying hens. *International Journal of Advanced Research*, *8*, 312-317

Elhussiny, M. Z., Tran, P. V., Pham, C. V., Nguyen, L. T., Haraguchi, S., Gilbert, E. R., Cline, M. A., Bungo, T., Furuse, M., & Chowdhury, V. S. (2021). Central GABAA receptor mediates taurine-induced hypothermia and possibly reduces food intake in thermo-neutral chicks and regulates plasma metabolites in heat-exposed chicks. *Journal of Thermal Biology*, *98*, 102905.

Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A., & Olsen, G.J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*, 2461–2470.

Gibson, G.R., Probert, H.M., Loo, J.V., Rastall, R.A., & Roberfroid, M.B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, *17,* 259–275.

Gil, M. G., Gomez-Raya, L., Torres, O., Cigarroa-Vazquez, F. A., Davila, S. G., & Rauw, W. M. (2023). Heterophil/lymphocyte response of local Spanish breeds of laying hens to cold stress, heat stress, and water restriction. *Journal of Thermal Biology*, *113*, 103542.

Gul, K., Yousuf, B., Singh, A., Singh, P., & Wani, A. A. (2015). Rice bran: Nutritional values and its emerging potential for development of functional food - A review. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, *6*(1), 24-30.

Gunn, J. S. (2000). Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes and Infection*, *2*(8), 907-913.

Han, J., Zhao, X., Zhao, X., Wang, Q., Li, P., & Gu, Q. (2023). Microbial-derived γ-aminobutyric acid: synthesis, purification, physiological function, and applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *71*(41), 14931-14946.

Hervo, F., Létourneau-Montminy, M. P., Méda, B., & Narcy, A. (2024). Effect of limestone particle size and microbial phytase on phosphorus and calcium digestion kinetics along the gastrointestinal tract in laying hens. *British Poultry Science*, *65*(5), 605–614.

Huang, S., Rong, X., Liu, M., Liang, Z., Geng, Y., Wang, X., Zhang, J., Ji, C., Zhao, L., & Ma, Q. (2022). Intestinal mucosal immunity-mediated modulation of the gut microbiome by oral delivery of *Enterococcus faecium* against *Salmonella* Enteritidis pathogenesis in a laying hen model. *Front Immunol.*, *2022* (13), 853954.

Jeong, S.-B., Kim, Y. B., Lee, J.-W., Kim, D.-H., Moon, B.-H., Chang, H.-H., Choi, Y.-H., & Lee, K.-W. (2020). Role of dietary gamma-aminobutyric acid in broiler chickens raised under high stocking density. *Animal Nutrition*, *6*(3), 293-304.

Jo, M.-H., Hong, S.-J., Lee, H.-N., Ju, J.-H., Park, B.-R., Lee, J.-h., Kim, S.-A., Eun, J.-B., Wee, Y.-J., & Kim, Y.-M. (2019). Gamma-aminobutyric acid production from a novel *Enterococcus avium* JS-N6B4 strain isolated from edible insects. *Poultry Science*, *95*(12), 2829-2835.

Kalode, V., & Patil, P. (2023). *Enterococcus* species: a systemic review. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, *17*(2).

Khalifa, A., & Ibrahim, H. I. M. (2023). Enterococcus faecium from chicken feces improves chicken immune response and alleviates *Salmonella* infections: A pilot study. *Journal of Animal Science*, *101*, skad016.

Kierończyk, B., Rawski, M., Długosz, J., Świątkiewicz, S., & Józefiak, D. (2016). Avian crop function–a review. *Annals of Animal Science*, *16*(3), 653-678.

Kim, D.-H., Dasagrandhi, C., Park, S.-K., Eom, S.-H., Huh, M.-K., Mok, J.-S., & Kim, Y.-M. (2018). Optimization of gamma-aminobutyric acid production using sea tangle extract by lactic acid bacterial fermentation. *LWT*, *90*, 636-642.

Kim, D.-H., & Lee, K.-W. (2023). An update on heat stress in laying hens. *World's Poultry Science Journal*, *79*(4), 689-712.

Kim, Y. B., Park, J., Lee, H.-G., Song, J.-Y., Kim, D.-H., Ji, W., Joo, S. S., Kim, M., Jung, J. Y., & Kim, M. (2024). Dietary probiotic *Lacticaseibacillus paracasei* NSMJ56 modulates gut immunity and microbiota in laying hens. *Poultry Science*, 103505.

Kolupaev, Y. E., Shakhov, I., Kokorev, A., Dyachenko, A., & Dmitriev, A. (2024). The role of reactive oxygen species and calcium ions in implementing the stress-protective effect of γ-aminobutyric acid on wheat seedlings under heat stress conditions. *Cytology and Genetics*, *58*(2), 81-91.

Li, T., Luo, B., Zou, X., Yin, J., Lv, S., Wang, J., & Gong, L. (2024). *Enterococcus avium* from a traditional Chinese liquor fermentation system with the potential for the *de novo* synthesis of GABA. *LWT*, *206*, 116560.

Mangan, M., & Siwek, M. (2024). Strategies to combat heat stress in poultry production - A review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *108*(3), 576-595.

Martínez, S., López, M., & Bernardo, A. (2003). Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. *Letters in Applied Microbiology*, *37*(6), 475-481.

Maasjost J., Mühldorfer K., De Jäckel S.C., & Hafez H.M. (2015). Antimicrobial susceptibility patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from poultry flocks in Germany. *Avian Diseases*, *59*, 143–148.

Morgan, N., Walk, C., Bedford, M., & Burton, E. (2014). The effect of dietary calcium inclusion on broiler gastrointestinal pH: Quantification and method optimization. *Poultry Science*, *93*(2), 354-363.

Park, J., Jeong, J., Lee, S., & Kim, I. (2016). Effect of dietary supplementation with a probiotic (*Enterococcus faecium*) on production performance, excreta microflora, ammonia emission, and nutrient utilization in ISA brown laying hens. *Poultry Science*, *95*(12), 2829-2835.

Park, J., & Kim, I. (2015). Effects of dietary gamma-aminobutyric acid on egg production, egg quality, and blood profiles in layer hens. *Veterinarni Medicina*, *60*(11), 629-634.

Phuengjayaem, S., Booncharoen, A., & Tanasupawat, S. (2021). Characterization and comparative genomic analysis of gamma-aminobutyric acid (GABA)-producing lactic acid bacteria from Thai fermented foods. *Biotechnology Letters*, *43*(8), 1637-1648.

Recoules, E., Lessire, M., Labas, V., Duclos, M. J., Combes-Soia, L., Lardic, L., Peyronnet, C., Quinsac, A., Narcy, A., & Réhault-Godbert, S. (2019). Digestion dynamics in broilers fed rapeseed meal. *Scientific Reports, 9*(1), 3052.

Rodríguez-Sánchez, S., Fernández-Pacheco, P., Seseña, S., Pintado, C., & Palop, M. L. (2021). Selection of probiotic *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity to be used as biocontrol agents in food industry. *LWT*, *143*, 111142.

Ruiz, L., Margolles, A., & Sánchez, B. (2013). Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Frontiers in Microbiology*, *4*, 396.

Salim, H. M., Huque, K. S., Kamaruddin, K. M., & Beg, M. (2018). Global restriction of using antibiotic growth promoters and alternative strategies in poultry production. *Science Progress*, *101*(1), 52-75.

Shaji, S., Selvaraj, R. K., & Shanmugasundaram, R. (2023). *Salmonella* infection in poultry: a review on the pathogen and control strategies. *Microorganisms*, *11*(11), 2814.

Sharma, C., Gulati, S., Thakur, N., Singh, B. P., Gupta, S., Kaur, S., Mishra, S. K., Puniya, A. K., Gill, J. P. S., & Panwar, H. (2017). Antibiotic sensitivity pattern of indigenous lactobacilli isolated from curd and human milk samples. *3 Biotech*, *7*, 1-14.

Sirisopapong, M., Shimosato, T., Okrathok, S., & Khempaka, S. (2023). Assessment of lactic acid bacteria isolated from the chicken digestive tract for potential use as poultry probiotics. *Animal Bioscience*, *36*(8), 1209.

Sobczak, A., & Kozłowski, K. (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.

Špelina, V., Schlemmerová, L., Landfeld, A., Kýhos, K., Měřička, P., & Houška, M. (2007). Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*. *Czech Journal of Food Sciences*, *25*(5), 283.

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(7), 3022-3027.

Tan, X., Zhang, Q., Liu, J., Shang, Y., Min, Y., Sun, X., & Tang, J. (2024). Enhanced γ-aminobutyric acid production by co-culture fermentation with *Enterococcus faecium* AB157 and *Saccharomyces cerevisiae* SC125. *LWT*, *208*, 116739.

Tancharoenrat, P., Zaefarian, F., & Ravindran, V. (2022). Composition of chicken gallbladder bile. *British Poultry Science*, *63*(4), 548-551.

Xu, Y., Li, D., Ding, X., Wang, Y., Liang, S., Xie, L., Zhang, Y., Fu, A., Yu, W., & Zhan, X. (2023). Probiotic characterization and comparison of broiler-derived lactobacillus strains based on technique for order preference by similarity to ideal solution analysis. *Poultry Science*, 102(5), 102564.

Yang, B., Huang, S., Zhao, G., & Ma, Q. (2022). Dietary supplementation of porcine bile acids improves laying performance, serum lipid metabolism and cecal microbiota in late-phase laying hens. *Animal Nutrition*, *11*, 283-292.

Yao, L., Lyu, C., Wang, Y., Hu, S., Zhao, W., Cao, H., Huang, J., & Mei, L. (2023). High-level production of γ-aminobutyric acid via efficient co-expression of the key genes of glutamate decarboxylase system in Escherichia coli. *Engineering Microbiology*, *3*, 100077.

Zhang, M., ZOU, X. t., Li, H., DONG, X. y., & Zhao, W. (2012). Effect of dietary γ-aminobutyric acid on laying performance, egg quality, immune activity and endocrine hormone in heat-stressed Roman hens. *Animal Science Journal*, *83*(2), 141-147.

Zhang, Q., Xiang, J., Zhang, L., Zhu, X., Evers, J., Werf, W., & Duan, L. 2014. Optimizing soaking and germination conditions to improve gamma-aminobutyric acid content in japonica and indica germinated brown rice. *Journal of Functional Foods* ,*10*, 283-291.

Zhou, X., Willems, R. J., Friedrich, A. W., Rossen, J. W., & Bathoorn, E. (2020). *Enterococcus faecium*: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, *9*, 1-13.

Zhu, Y., Cheng, J., Ren, M., Yin, L., & Piao, X. (2015). Effect of γ-aminobutyric acid-producing *Lactobacillus* strain on laying performance, egg quality and serum enzyme activity in Hy-Line brown hens under heat stress. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *28*(7), 1006.

Zommiti, M., Chevalier, S., Feuilloley, M.G.J., & Connil, N. (2022). Special Issue "Enterococci for probiotic use: safety and risk": Editorial. *Microorganisms*, *10*(3), 604.