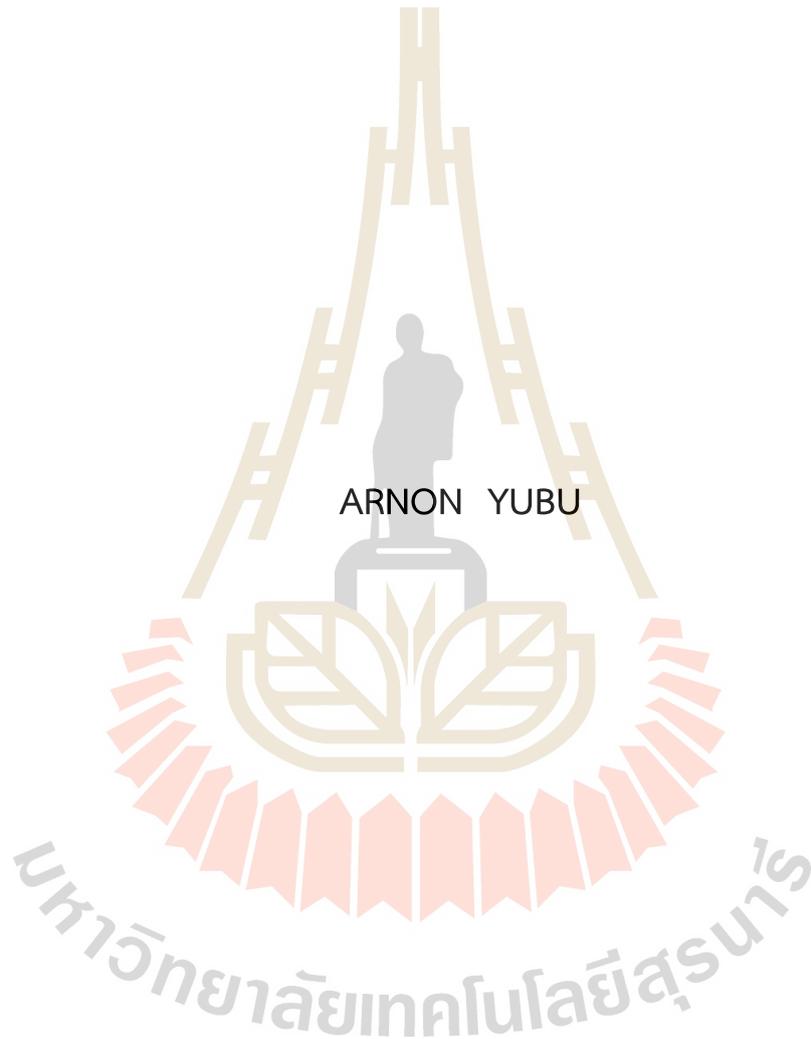


ผลของโพรไบโอติก *Ligilactobacillus salivarius* I203 รูปแบบเซลล์มีชีวิต
และเซลล์ตายต่อสุขภาพลำไส้ของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2567

EFFECT OF LIVE AND DEAD CELL PROBIOTIC *Ligilactobacillus*
salivarius I203 ON GUT HEALTH OF BROILER CHICKENS
STIMULATED WITH LIPOPOLYSACCHARIDE



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Animal Production Technology
Suranaree University of Technology
Academic Year 2024

อานนท์ อยู่บู่ : ผลของโพรไบโอติก *Ligilactobacillus salivarius* I203 รูปแบบเซลล์มีชีวิต และเซลล์ตายต่อสุขภาพลำไส้ของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (EFFECT OF LIVE AND DEAD CELL PROBIOTIC *Ligilactobacillus salivarius* I203 ON GUT HEALTH OF BROILER CHICKENS STIMULATED WITH LIPOPOLYSACCHARIDE)
อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. สุทิสรา เข้มพะกา, 52 หน้า.

คำสำคัญ: ไก่เนื้อ/ไลโปโพลีแซคคาไรด์/*L. salivarius* I203/โพรไบโอติก/โพลีโพรไบโอติก/รูปแบบเซลล์มีชีวิต/รูปแบบเซลล์ตาย/ไลโซไซม์/อวัยวะภูมิคุ้มกัน/กรดไขมันสายสั้น/ลักษณะสัญญาณวิทยาของลำไส้/การอักเสบ/ไซโตไคน์/ไทด์จังก์ชัน

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตไก่เนื้อกำลังเผชิญกับความท้าทายหลายประการ ทั้งจากความเครียดจากความร้อน ความเครียดทางภูมิคุ้มกัน รวมถึงมาตรการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะเสริมในอาหารสัตว์เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต ส่งผลกระทบต่อสุขภาพและสมรรถนะการผลิตของไก่เนื้อ ดังนั้นการใช้สารสุขภาพในอาหาร เช่น โพรไบโอติก จึงได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมสุขภาพลำไส้ เพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมสารอาหาร และปรับสมดุลการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตของไก่เนื้อดีขึ้น จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus spp.* โดยเฉพาะ *Lactobacillus salivarius* ซึ่งต่อมาได้รับการจำแนกใหม่ เป็น *Ligilactobacillus salivarius* (*L. salivarius*) พบได้ตามธรรมชาติในระบบทางเดินอาหารของสัตว์หลายชนิดรวมทั้งสัตว์ปีก การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ *L. salivarius* I203 ต่อสุขภาพลำไส้ของไก่เนื้อภายใต้สภาวะที่เหนียวนำไปเกิดการอักเสบ โดยใช้สารพิษไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide, LPS) จาก *Escherichia coli* เป็นตัวกระตุ้น ใช้ไก่อายุ 1 วัน จำนวน 90 ตัว ถูกสุ่มแบ่งออกเป็น 9 กลุ่มทดลอง ได้แก่ 1) กลุ่มควบคุม (ฉีด phosphate-buffered saline, PBS) 2) กลุ่มควบคุมลบ (ฉีด LPS) 3) กลุ่มควบคุมบวก เสริมยาปฏิชีวนะ zinc bacitracin (ฉีด LPS) กลุ่มที่ 4-6 กลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* I203 แบบเซลล์มีชีวิตที่ระดับ 1×10^7 – 1×10^9 CFU/ตัว/วัน (ฉีด LPS) กลุ่มที่ 7-9 กลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* I203 แบบเซลล์ตายที่ระดับ 1×10^7 – 1×10^9 CFU/ตัว/วัน (ฉีด LPS) เมื่อไก่มีอายุครบ 14 วัน กลุ่มที่ 2-9 ได้รับการกระตุ้นด้วยการฉีด LPS (1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ทางช่องท้อง ในขณะที่ไก่กลุ่มที่ 1 ได้รับการฉีด PBS เพื่อเปรียบเทียบ หลังผ่านไป 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเลือด เนื้อเยื่อลำไส้ อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และสิ่งย่อยในซีรัม เพื่อตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะที่

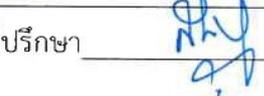
เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ในซีรัม การผลิตกรดไขมันสายสั้น กรดแลคติก และแอมโมเนีย ผลการศึกษาพบว่า การได้รับ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย สามารถเพิ่มน้ำหนักตัวของไก่เนื้อช่วง อายุ 7 14 และ 15 วัน ลดน้ำหนักสัมพัทธ์ของเบอร์ซา และเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์ในซีรัม นอกจากนี้ยังพบว่า *L. salivarius* I203 มีผลปรับปรุงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กในไก่เนื้อที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ *L. salivarius* I203 ยังช่วยเพิ่มการผลิตกรดไขมันสายสั้น ได้แก่ กรดบิวทริก กรดไขมันสายสั้นสายโซ่กิ่ง กรดวาเลอริก และกรดแลคติก รวมถึงลดการผลิตแอมโมเนียในซีรัม การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนพบว่า *L. salivarius* I203 สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของผนังลำไส้ ได้แก่ *OCLN*, *CLDN1* และ *JAM2* และยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเยื่อเมือก (*MUC2*) โดยเซลล์มีชีวิตสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *OCLN* และ *MUC2* ขณะที่ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายสามารถเพิ่มการแสดงออกของ *JAM2* นอกจากนี้จุลินทรีย์ทั้งสองรูปแบบ ยังลดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่กระตุ้นการอักเสบ (*TNF- α* และ *IL-1 β*) ในเนื้อเยื่อตับ และรูปแบบเซลล์มีชีวิตยังสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่ลดการอักเสบ (*IL-4*) การวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนโดยใช้เทคนิค Fourier-transform Infrared Spectroscopy (FTIR) พบว่า *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์ตาย มีสัดส่วนของโครงสร้าง β -sheet ของ S-layer protein เพิ่มขึ้น (63.5%) เมื่อเทียบกับเซลล์มีชีวิต (37.4%) ขณะที่โครงสร้าง α -helix ลดลง การเปลี่ยนแปลงนี้อาจมีบทบาทในการกำหนดกลไกการออกฤทธิ์ของโปรไบโอติกในรูปแบบเซลล์ตาย

การศึกษาในครั้งนี้บ่งชี้ว่า โปรไบโอติก *L. salivarius* I203 มีศักยภาพในการส่งเสริมสุขภาพลำไส้ของไก่เนื้อในภาวะที่มีการกระตุ้นการอักเสบ ทั้งในด้านการปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกัน การลดการอักเสบ และการเพิ่มความสมบูรณ์ของเยื่อบุลำไส้

สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์
ปีการศึกษา 2567

ลายมือชื่อนักศึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ARNON YUBU : EFFECT OF LIVE AND DEAD CELL PROBIOTIC *Lactobacillus salivarius* I203 ON GUT HEALTH OF BROILER CHICKENS STIMULATED WITH LIPOPOLYSACCHARIDE. ADVISOR. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SUTISA KHEMPAKA, Ph.D., 52 PP.

Keyword: Broiler/Lipopolysaccharide/*L. salivarius* I203/Probiotic/Postbiotic/Live cell/Dead cell/Lysozyme/Immune organ/Short-Chain Fatty Acid/ Intestinal morphology/ Inflammation/Cytokine/Tight junction

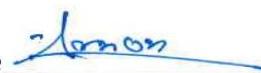
The broiler industry is currently facing multiple challenges, including heat stress, immunological stress, and regulatory restrictions on the use of antibiotic growth promoters in animal feed. These factors adversely affect the health and productivity of broiler chickens. Consequently, the inclusion of functional feed additives such as probiotics has gained increasing interest due to their potential to enhance gut health, improve nutrient absorption efficiency, and modulate immune function, thereby promoting broiler productivity. Among *Lactobacillus* spp., particularly *Lactobacillus salivarius* was later reclassified as *Ligilactobacillus salivarius* (*L. salivarius*), and is naturally found in the gastrointestinal tract of various animals, including poultry. The present study aimed to investigate the effects of *L. salivarius* I203 on gut health in broiler chickens under inflammation-induced conditions using lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* as the inflammatory stimulant. A total of 90 one-day-old broiler chicks were randomly assigned into 9 experimental groups: 1) control group (injected with phosphate-buffered saline, PBS); 2) negative control group (injected with LPS); 3) positive control group (supplemented zinc bacitracin and injected with LPS); groups 4–6) groups administered live *L. salivarius* I203 at doses of 1×10^7 to 1×10^9 CFU/bird/day (injected with LPS); and groups 7–9) groups administered heat-killed *L. salivarius* I203 at the dose levels of 1×10^7 to 1×10^9 CFU/bird/day (injected with LPS). On day 14, birds in groups 2–9 were intraperitoneally challenged with LPS (1 mg/kg body weight), while group 1 received PBS injection for comparison. After 24 hours, blood, intestinal tissue, immune-related organs, and cecal digesta were collected for

analysis of cytokine gene expression, relative immune organ weights, intestinal histomorphology, serum lysozyme activity, and levels of short-chain fatty acids (SCFAs), lactic acid, and ammonia. The results showed that both live and dead cell forms of *L. salivarius* I203 administration improved body weight at days 7, 14, and 15, decreased bursa of Fabricius relative, and increased in serum lysozyme activity. In addition, it was found that *L. salivarius* I203 improved morphology of small intestine in broiler chickens challenged with LPS. *L. salivarius* I203 also enhanced the production of SCFAs, including butyric acid, branched-chain short chain fatty acids, valeric acid, and lactic acid, while reducing ammonia concentration in the cecum. Gene expression analysis revealed that *L. salivarius* I203 stimulated the expression of gut barrier integrity-related genes, namely *OCN*, *CLDN1*, and *JAM2*, and genes associated with mucin production (*MUC2*). Live cells upregulate the expression of *OCN* and *MUC2* genes, while both live and dead cell forms increased the expression of *JAMs*. In addition, both cell forms decreased the expression of pro-inflammatory cytokine genes (*TNF- α* and *IL-1 β*) in the liver, and the live cell form also enhanced the the expression of pro-inflammatory cytokine gene (*IL-4*). Secondary structure analysis of proteins using Fourier-transform Infrared Spectroscopy (FTIR) indicated that the dead cell form of *L. salivarius* I203 exhibited a higher proportion of β -sheet structure in the S-layer protein (63.5%) compared to the live-cell form (37.4%), whereas the α -helix structure was reduced. This structure alteration may play a role in determining the mechanism of action of probiotics in dead cell form.

This study indicates that the probiotic *L. salivarius* I203 has the potential to promote intestinal health in broiler chickens under inflammatory conditions. Its beneficial effects include modulation of the immune system, reduction of inflammation, and enhancement of intestinal epithelial integrity.

School of Animal Technology and Innovation
Academic Year 2024

Student's Signature



Advisor's Signature



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความรู้เป็นอย่างสูงจาก รองศาสตราจารย์ ดร. สุทิศา เข้มผะกา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ประสิทธิ์ประสาทวิชา แนะนำแนวคิดและฝึกฝน ทักษะที่เป็นประโยชน์ ทั้งในด้านความรู้ทางวิชาการ การดำเนินการทดลอง ทักษะในการวิเคราะห์ และสังเคราะห์ข้อมูล ทักษะการเขียนบทความทางวิชาการและการนำเสนอผลงาน รวมถึงการ ตรวจสอบและแนะนำในการแก้ไข ข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดจนสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการดำเนินงาน ทดลอง จนกระทั่งวิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณคณาจารย์ สาขาวิชาเทคโนโลยีและ นวัตกรรมทางสัตว์ สาขาวิชาปรีคลินิก และสาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่กรุณา ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ทางด้านวิชาการ ทักษะและกระบวนการคิด ตลอดจนประสบการณ์ต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์จนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณทุน SUT-OROG จากกองทุนสนับสนุนการวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี ที่สนับสนุนค่าธรรมเนียมทางการศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่งานสัตว์ปีก ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์ สถานที่ ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือต่าง ๆ ตลอดจนงานทดลอง ตลอดจนการอำนวยความสะดวก ในการใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ผลจากทางศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีสุรนารี

ขอขอบคุณสมาชิกทุกท่านของห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์กระเพาะเดี่ยว (F14117) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับคำแนะนำและการช่วยเหลือต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการศึกษา ทั้งในด้านการเรียน การดำเนินการทดลอง การวิเคราะห์ผล การพัฒนาทักษะการพูดการนำเสนอ ตลอดจนแนะนำการใช้ชีวิตในมหาวิทยาลัย

ท้ายที่สุดนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา คุณยายสมควร ไพศาล และคุณยายวิไลพร ไพศาล ที่ได้อบรมเลี้ยงดูส่งเสริม อุปถัมภ์ทางการศึกษาและมอบโอกาสที่ดีมาโดยตลอด อีกทั้ง ขอนอมรำลึกถึงพระคุณของครูบาอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้จนประสบความสำเร็จ ได้ในวันนี้

อานนท์ อยู่บู่

สารบัญ

หน้า

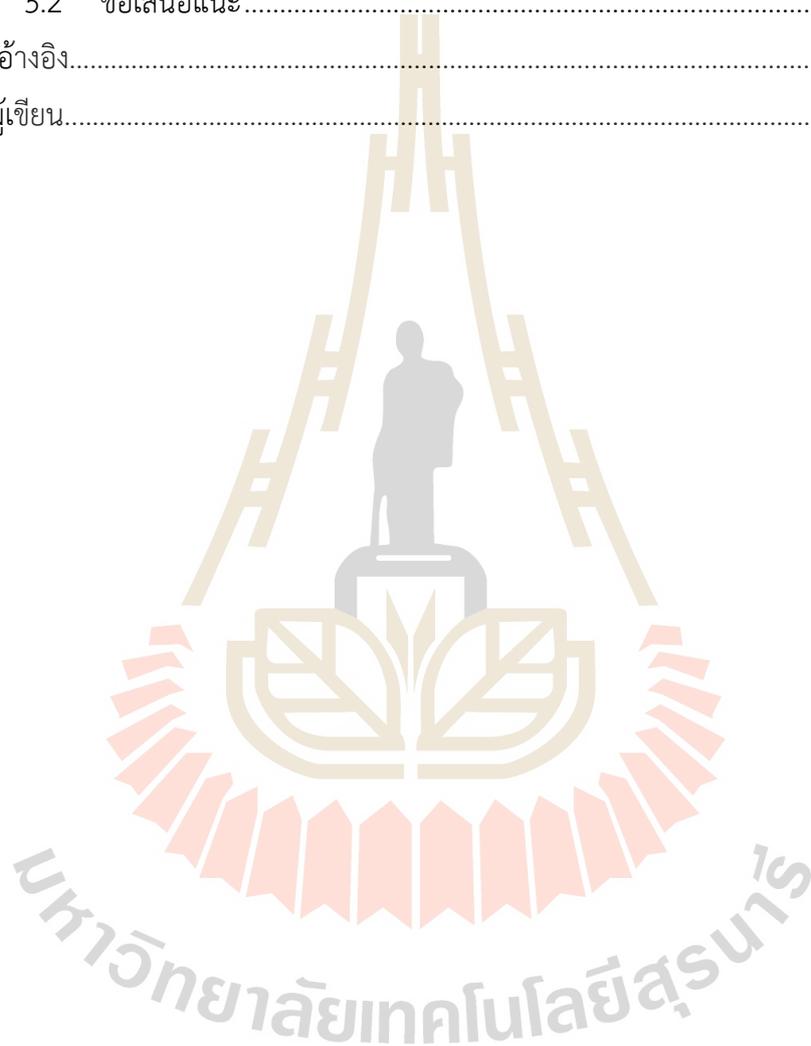
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูป.....	ญ
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
1.3 สมมุติฐานของการวิจัย.....	3
1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2 ปรัชญ์นวัตรกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ผลกระทบของการเกิดลำไส้อักเสบในทางเดินอาหารของสัตว์ปีก	5
2.2 จุลินทรีย์โพรไบโอติกปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำวิจัย.....	7
2.3 ศักยภาพความเป็นโพรไบโอติกของ <i>L. salivarius</i> ในทางเดินอาหาร	8
2.4 โพรไบโอติก.....	11
2.5 บทบาทของ <i>L. salivarius</i> รูปแบบเซลล์มีชีวิตและรูปแบบเซลล์ตายต่อการยับยั้งการอักเสบในไก่เนื้อ.....	12
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
3.1 สัตว์ทดลอง.....	15
3.2 การเตรียมตัวอย่างจุลินทรีย์เซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย.....	15
3.3 การป้อนจุลินทรีย์ <i>L. salivarius</i> I203 การเหนี่ยวนำการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ และการเก็บตัวอย่าง	16
3.4 อาหารและกลุ่มการทดลอง.....	16
3.5 การวิเคราะห์ตัวอย่าง.....	18

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของลำไส้ (intestinal morphology).....	18
3.5.2 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโรค (gene expression of immune response).....	19
3.5.3 การผลิตกรดไขมันสายสั้น กรดแลคติก และแอมโมเนียในซีกัม (SCFAs, lactic acid and ammonia production).....	20
3.5.4 การประเมินโครงสร้างของผนังเซลล์ <i>L. salivarius</i> I203 ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) Microspectroscopy.....	21
3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	22
3.7 สถานที่ทำการทดลอง.....	22
4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	23
4.1 ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติก <i>L. salivarius</i> I203 ต่อน้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และการทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์ของไก่เนื้อ ที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์.....	23
4.2 ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติก <i>L. salivarius</i> I203 ต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของลำไส้ของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์.....	27
4.3 ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติก <i>L. salivarius</i> I203 ต่อการผลิตกรดไขมันสายสั้น กรดแลคติก และการผลิตแอมโมเนียในซีกัมของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์.....	31
4.4 ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติก <i>L. salivarius</i> I203 ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของผนังลำไส้และการผลิตเยื่อเมือกในลำไส้เล็กส่วนกลางของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์.....	33
4.5 ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติก <i>L. salivarius</i> I203 ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นและยับยั้งการอักเสบในตับของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์.....	36
4.6 ผลของการใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) Microspectroscopy เพื่อศึกษาโครงสร้างของผนังเซลล์ <i>L. salivarius</i> I203.....	41
5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....	43

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.1 บทสรุป.....	43
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	43
รายการอ้างอิง.....	45
ประวัติผู้เขียน.....	72



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 การส่งออกผลิตภัณฑ์ไก่เนื้อของโลก	5
2.2 แสดงคุณสมบัติจุลินทรีย์โพรไบโอติก <i>Lactobacillus salivarius</i>	9
3.1 ส่วนประกอบและปริมาณโภชนะในสูตรอาหารพื้นฐาน	17
3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real time PCR	20
4.1 ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติก <i>L. salivarius</i> I203 ต่อน้ำหนักตัว น้ำหนักสัมพัทธ์ของ อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และระดับเอนไซม์ไลโซไซม์ในซีรัมของไก่เนื้อที่กระตุ้น ด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์	26
4.2 ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติก <i>L. salivarius</i> I203 ต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของลำไส้ ของไก่เนื้อที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์	30
4.3 ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติก <i>L. salivarius</i> I203 ต่อกาการผลิตกรดไขมันสายสั้น กรดแลกติก และการผลิตแอมโมเนียในซีรัมของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นด้วย ไลโปโพลีแซคคาไรด์	34
4.4 ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติก <i>L. salivarius</i> I203 ต่อกการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง กับความแข็งแรงของผนังลำไส้และเยื่อเมือก ในลำไส้ลำไส้เล็กส่วนกลางของไก่เนื้อ ที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์	37
4.5 ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติก <i>L. salivarius</i> I203 ต่อกการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง กับการกระตุ้นและยับยั้งการอักเสบในตับของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์	40
4.6 แสดงโครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure) ของโปรตีน S-layer ในผนังเซลล์ จุลินทรีย์โพรไบโอติก <i>L. salivarius</i> I203	41

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	กลไกความเครียดทางภูมิคุ้มกันต่อระบบประสาท ต่อมไร้ท่อ และระบบภูมิคุ้มกัน.....	7
2.2	กลไกการทำงานของโพสไบโอติกในทางเดินอาหารของไก่.....	8
2.3	ผลของการยี้ดเกาะของแลคโตบาซิลลัสบน bare polystyrene microtiter plates.....	10
2.4	องค์ประกอบและกลไกที่เป็นไปได้ของโพสไบโอติกต่อผนังลำไส้	12
2.5	กลไกการป้องกันเชื้อก่อโรคของเชื้อ <i>L. salivarius</i> บนเยื่อบุผนังลำไส้ของไก่เนื้อ.....	13
4.1	แสดงภาพรวมผลกระทบของ LPS และผลของการป้องกันจุลินทรีย์ <i>L. salivarius</i> I203 ในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย.....	42

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อุตสาหกรรมการผลิตเนื้อไก่ของโลกมีอัตราการเพิ่มสูงขึ้นในทุก ๆ ปี ตามประชากรโลกที่เพิ่มสูงขึ้นซึ่งคาดว่าจะสูงถึง 9,000 ล้านคนในปี ค.ศ. 2050 ส่งผลให้ผู้ผลิตในหลาย ๆ ประเทศ รวมถึงประเทศไทยมีการขยายกำลังการผลิต และเพิ่มความหนาแน่นในการเลี้ยง เพื่อให้สามารถตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภคได้ ส่งผลให้ไก่เนื้อเกิดความเครียด สุขภาพอ่อนแอ และสมรรถนะการผลิตลดลง (Li et al, 2015) ในขณะเดียวกันจากมาตรการยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตตั้งแต่ปี ค.ศ. 2006 เนื่องจากข้อกังวลของผู้บริโภคในเรื่องของการตกค้างของยาปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์ ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้สุขภาพลำไส้ (gut health) ของไก่เนื้ออ่อนแอ เพิ่มโอกาสในการเกิดโรคได้มากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากไก่เนื้อเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด (เช่น การเลี้ยงที่หนาแน่น ความเครียดจากความร้อน และอื่น ๆ) จะส่งผลทำให้ลำไส้เสียสภาวะสมดุล (dysbiosis) ประชากรจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลง ภูมิคุ้มกันบกพร่อง ชั้นเยื่อเมือกถูกทำลาย ลำไส้เกิดการอักเสบและรั่ว (leaky gut) ส่งผลกระทบต่อเนื่องต่อการย่อยและดูดซึมสารอาหาร และสมรรถนะการผลิตที่ลดลง นอกจากนี้อาการท้องร่วงที่เกิดจากการขับของเหลวออกในลำไส้ยังมีผลทำให้วัสดุรองพื้นมีความชื้นสูง ส่งเสริมให้จุลินทรีย์ก่อโรคเจริญเติบโตดีขึ้น การหาสารเสริมทางเลือกเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่น โพรไบโอติก *Ligilactobacillus salivarius* เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าจะสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้

โพรไบโอติก คือจุลินทรีย์ในรูปแบบที่มีชีวิตที่มีประโยชน์ ซึ่งเมื่อสัตว์ได้รับแล้วจะช่วยปรับปรุงคุณสมบัติและสมดุลจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารให้เหมาะสม ทำให้สัตว์เจริญเติบโตและให้ผลผลิตที่ดี โดยจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นกลุ่มของ *Lactobacillus* spp. เนื่องจากได้รับการยอมรับในความปลอดภัย (Generally Recognized As Safe; GRAS) *Ligilactobacillus salivarius* I203 หรือ *L. salivarius* I203 I203 (สกุลเดิม *Lactobacillus* spp.) เป็นจุลินทรีย์ที่ได้จากการคัดแยกจากห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์กระเพาะเดียว ผ่านการประเมินคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกที่เหมาะสมทั้งการทนต่อสภาวะในทางเดินอาหารที่มี pH ต่ำ และเกลือแร่ที่มีความเข้มข้นสูง ความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค รวมถึงทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ (Sirisopapong et al., 2023) จากการรวบรวมเอกสาร พบว่าการเสริม *L. salivarius* ในอาหารที่ระดับ 10^8 CFU/kg สามารถลดการหลั่งไซม์ไตโคไนท์ที่ก่อให้เกิดการ

อักเสบ TNF- α และ IL-1 β ที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนท้าย (ileum) ของไก่เนื้ออายุ 8 สัปดาห์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยเชื้อ *E. coli* ได้ (Wang et al., 2020) สอดคล้องกับรายงานของ Sureshkumar et al. (2021) ศึกษาผลของ *L. salivarius* WT ที่ระดับ 10^9 CFU (โดยการป้อน) ในไก่เนื้อที่อายุ 10 สัปดาห์ พบว่าสามารถลดการหลั่งไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ IL-8 และ TNF- α นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มปริมาณไซโตไคน์ต้านการอักเสบ IL-6 ในเลือดได้ ทั้งยังส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ นอกจากนี้ในหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) พบว่า *L. salivarius* สามารถลดการผลิตไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ TNF- α ในพลาสมา (ลดปริมาณไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ IL-2 และ IL-5 และเพิ่มปริมาณไซโตไคน์ต้านการอักเสบ IL-10) และลดการผลิต IgG ได้ (Arribas et al., 2012)

ปัจจุบัน การใช้โพรไบโอติกในรูปแบบของเซลล์ตาย (dead cell) กำลังได้รับความสนใจมากขึ้น โดยมีการให้คำจำความสารเสริมสุขภาพกลุ่มนี้ว่า โพรไบโอติก (postbiotics) ซึ่งหมายถึงจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่อยู่ในรูปแบบเซลล์ตาย (dead cell) ส่วนประกอบของเซลล์ (cell component) รวมถึงส่วนใสที่ปราศจากตัวเซลล์ (cell free supernatant) ซึ่งเป็นสารเสริมสุขภาพแบบอโลไลท์ที่ได้จากจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ยังมีชีวิต โดยสารเหล่านี้สามารถส่งผลดีต่อร่างกายของโฮสต์ทั้งทางตรงและทางอ้อม (Zhong et al., 2022) โดยในประเด็นของการใช้โพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์ตายสำหรับสัตว์ปีก มีรายงานการว่า การเสริม heat-killed *L. salivarius* ที่ผ่านกระบวนการทำให้ตายด้วยความร้อน ที่ระดับ 400 กรัมต่อต้นอาหาร (9×10^9 CFU/g feed) ในอาหารไก่ไข่ สามารถส่งเสริมประสิทธิภาพการใช้อาหาร เพิ่มผลผลิตไข่ ลดระดับคอเลสเตอรอลรวมและคอเลสเตอรอลชนิดไลโปโปรตีนในเลือด และเพิ่มระดับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H9 (H9 AIV antibody) ได้ (Zhang et al., 2012) นอกจากนี้ สารเมแทบอลิท์และกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acids) ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก ยังมีบทบาทในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค และช่วยส่งเสริมความสมดุลจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร โดยกลไกสำคัญคือการปรับสภาพแวดล้อมในลำไส้ให้มีความเป็นกรดมากขึ้น ส่งผลให้แบคทีเรียก่อโรคซึ่งมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงค่าของ pH ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Wang et al. 2020) นอกจากนี้ยังพบว่ามีผลของไซโตไคน์ที่กระตุ้นการอักเสบลดลง ซึ่งช่วยลดความเสียหายของเนื้อเยื่อในลำไส้อีกด้วย จาก การรวบรวมข้อมูลทางวิชาการเกี่ยวกับสารเมแทบอลิท์ เช่น แบคทีริโอซิน (bacteriocins) พบว่ามีรายงานการป้อน *L. salivarius* SMXD51 ซึ่งแยกได้จากบริเวณลำไส้เล็กและซีกัมของไก่เนื้อ โดยสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิตแบคทีริโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค *Campylobacter jejuni* ในซีกัมของไก่เนื้อที่อายุ 14 และ 35 วันได้ (Saint-Cyr et al., 2017) แบคทีริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกมีหลากหลายกลไกในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยทั่วไปมักออกฤทธิ์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ (Neville and O'Toole, 2010) นอกจากนี้ Wang et al. (2017) ได้รายงานการศึกษาโครงสร้างโมเลกุลของผนังเซลล์ *L. salivarius* REN ที่มีบทบาทต่อการยึดเกาะบนเยื่อผนังลำไส้ของ

มนุษย์ โดยใช้เทคนิค Circular Dichroism (CD) spectroscopy พบว่าองค์ประกอบสำคัญของ S-layer protein คือ choline-binding protein A (CbpA) ซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็นแบบ β -sheet ($\beta 1$ และ $\beta 3$ - $\beta 6$ และ $\beta 8$) โดยโครงสร้างดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มประสิทธิภาพการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อผนังลำไส้ จึงอาจก่อให้เกิดคุณสมบัติที่ประโยชน์ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านความสามารถในการยึดเกาะกับผนังลำไส้ ซึ่งอาจส่งผลโดยตรงต่อการยับยั้งการยึดเกาะเชื้อก่อโรคและความเสียหายของเยื่อลำไส้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อย่างไรก็ตาม ข้อมูลการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับผลของ *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์มีชีวิตต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ยังมีอยู่จำกัด อีกทั้งยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติของ *L. salivarius* I203 ในรูปแบบเซลล์ตายต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันภายใต้ภาวะการอักเสบ รวมถึงยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติระหว่างเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเชื้อ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายต่อสุขภาพลำไส้ของไก่เนื้อ

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาผลของจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายต่อสุขภาพลำไส้ของไก่เนื้อภายใต้ภาวะการอักเสบที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารพิษไลโปโพลีแซคคาไรด์ โดยประเมินผลต่อการแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ การผลิตกรดไขมันสายสั้น กรดแลคติก และแอมโมเนียในซีรัมในไก่เนื้อช่วงอายุ 1-14 วัน

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

จุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายมีคุณสมบัติในการส่งเสริมสุขภาพลำไส้ เช่น การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ลดการอักเสบในลำไส้เล็ก เพิ่มการผลิตกรดไขมันสายสั้น และกรดแลคติก รวมถึงลดการผลิตแอมโมเนียในซีรัมของไก่ภายใต้สภาวะการอักเสบ ทั้งนี้ การใช้จุลินทรีย์ในรูปแบบเซลล์ตายสามารถส่งผลเชิงบวกต่อสุขภาพลำไส้ของไก่เนื้อได้เทียบเท่ากับรูปแบบเซลล์มีชีวิต

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาประสิทธิภาพของโพรไบโอติก *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันในไก่เนื้อช่วงอายุ 1-14 วัน โดยไก่แต่ละกลุ่มได้รับการป้อน *L. salivarius* I203 ที่ระดับเข้มข้น 10^7 10^8 และ 10^9 CFU/ตัว/วัน ต่อเนื่องเป็นเวลา 14 วัน และได้รับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยการฉีดไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide,

LPS) ซึ่งสกัดจากผนังเซลล์ของเชื้อ *E. coli* O55:B5 เข้าบริเวณช่องท้องของไก่ (intraperitoneal injection) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ภายหลังจากกระตุ้นเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเลือด เนื้อเยื่อลำไส้ อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และสิ่งย่อยจากซีรัม เพื่อตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ ระดับเอนไซม์ไลโซไซม์ในซีรัม การผลิตกรดไขมันสายสั้น กรดแลคติก รวมถึงความสามารถในการลดการผลิตแอมโมเนียในซีรัม

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบถึงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ต่อบทตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน และความสามารถในการลดการอักเสบในลำไส้เล็กของไก่เนื้อช่วงอายุ 1-14 วัน ภายใต้อาหารที่ถูกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ

1.5.2 เข้าใจกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในสภาวะการอักเสบของสัตว์ที่ได้รับ *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์ตาย รวมถึงสามารถเปรียบเทียบคุณสมบัติระหว่างเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย

1.5.3 เป็นฐานข้อมูลสำหรับพัฒนาผลิตภัณฑ์สารเสริมสุขภาพจาก *L. salivarius* I203 เพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมไก่เนื้อในอนาคต

บทที่ 2

ปรัทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ผลกระทบของการเกิดลำไส้อักเสบในทางเดินอาหารของสัตว์ปีก

ปัจจุบันประเทศไทยเป็นเป็นผู้ส่งออกผลิตภัณฑ์เนื้อไก่เป็นอันดับ 4 ของโลก ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีมูลค่าสูงถึง 1.2 แสนล้านบาทในปี 2567 (กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ, 2566) และมีกำลังการผลิตเนื้อไก่มากเป็นอันดับ 7 ของโลก (Statista, 2022) ทำให้ทิศทางของการผลิตปศุสัตว์ทางการค้า (intensive farming) มีความต้องการผลผลิตที่สูง และมีความหนาแน่นในการเลี้ยงมากขึ้นตามมา (Li et al., 2015) ในขณะเดียวกันผู้บริโภคยังให้ความสนใจในเรื่องของอาหารปลอดภัยเพิ่มสูงขึ้น ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2006 ได้มีมาตรการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะเสริมในอาหารสัตว์เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต (antibiotic growth promoter, AGPs) เนื่องจากมีความกังวลเรื่องการตกค้างของยาปฏิชีวนะในผลิตภัณฑ์ (Brisbin et al., 2010) อย่างไรก็ตามจากสถานการณ์การผลิตรวมถึงมาตรการดังกล่าวส่งผลกระทบต่อสุขภาพของไก่โดยเพิ่มโอกาสให้สัตว์เกิดเครียดขึ้นได้ เช่น ความเครียดทางภูมิคุ้มกัน (immunological stress) นำมาทำให้เชื้อก่อโรคสามารถก่อตัว และเจริญอยู่ได้ในลำไส้ ก่อให้เกิดภาวะการอักเสบของลำไส้เพิ่มขึ้น ทั้งยังส่งผลกระทบต่ออัตราการลดลงของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย นำมาซึ่งประสิทธิภาพการผลิตที่ลดลง

ตารางที่ 2.1 การส่งออกผลิตภัณฑ์เนื้อไก่ของโลก

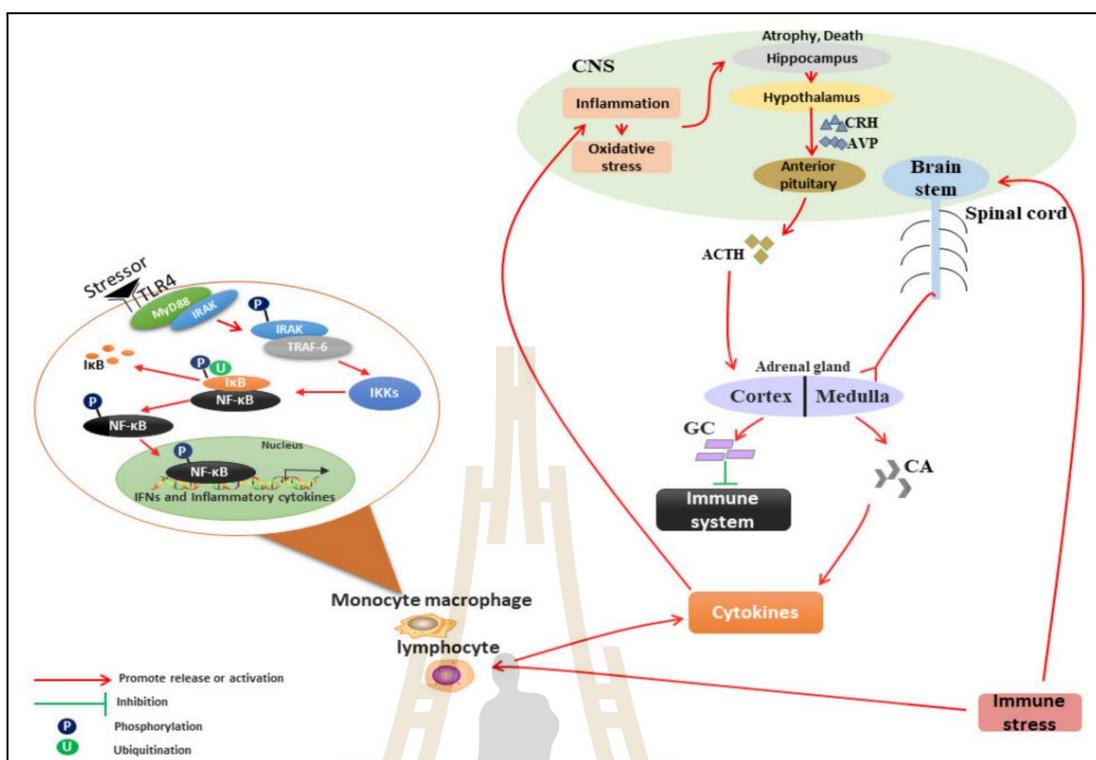
ลำดับ	ประเทศ	หน่วย มูลค่า: ล้านดอลลาร์สหรัฐ ปริมาณ: ตัน						มูลค่าส่งออกปี 66
		2565		2566		2567		
		มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	
	รวมทั้งหมด	23,230.25	13,838,274	21,575.39	13,801,665	24,520.34	13,976,568	
1	บราซิล	6,683.49	4,046,833	5,733.76	3,991,293	7,139.02	4,307,010	
2	สหรัฐอเมริกา	3,491.58	3,441,719	3,605.40	3,629,037	4,477.98	3,716,627	
3	สหภาพยุโรป	3,744.58	2,194,524	3,559.84	2,084,792	3,517.60	1,809,308	
4	ไทย	3,380.05	899,482	3,310.34	914,317	3,206.68	933,175	
5	จีน	1,551.65	427,852	1,353.24	388,012	1,592.18	456,845	
	อื่น ๆ	4,378.91	2,827,864	4,012.81	2,794,213	4,586.89	2,753,603	

ที่มา: กรมเจรจาการค้าระหว่างประเทศ, 2567

2.1.1 ความเครียดทางภูมิคุ้มกัน (immunological stress)

การตอบสนองต่อการอักเสบในสัตว์ปีกจะผ่านการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune cells) เช่น มาโครฟาจ (macrophages) แกรนูโลไซต์ (granulocytes) เซลล์เดนดริติก (dendritic cells), และเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ (intestinal epithelial cells, IEC) เป็นต้น ซึ่งจะมีการแสดงออกของ pattern recognition receptors (PRR) บนเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ เมื่อมีการตรวจจับองค์ประกอบของจุลินทรีย์ก่อโรค ในรูปแบบของ microbe-associated molecular patterns (MAMP) การตรวจจับนี้จะกระตุ้นตัวรับ TLR4 บนเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ ซึ่งจะเริ่มกระบวนการตอบสนองต่อการอักเสบผ่านกลไก MyD88 pathway และกระตุ้นการทำงานของ nuclear factor-kappa B (NF- κ B) pathway (ภาพที่ 2.1) ส่งผลให้เกิดการหลั่งโปรตีนไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory cytokine) เช่น IL-6, IL-8, IFN- γ ซึ่งช่วยกระตุ้นการทำงานของเฮเทอโรฟิล (heterophils) เซลล์ธรรมชาติ (natural killer, NK) มาโครฟาจ และ T cell เพิ่มเสริมการตอบสนองภูมิคุ้มกันในร่างกาย (Smith et al., 2016) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการตอบสนองดังกล่าวจะช่วยในการกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรค แต่หากตอบสนองต่อการอักเสบเกิดขึ้นในระดับที่สูงกว่าปกติและยาวนาน จะทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่ออย่างรุนแรง พร้อมทั้งนำไปสู่การอักเสบเรื้อรัง การหลั่งไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบในปริมาณมากเกินไปจะส่งผลให้เกิดภาวะอ้วนภูมิในร่างกายสูงขึ้น ลดความอยากอาหาร น้ำหนักลดลง และการเจริญเติบโตช้าลง (Berghman et al., 2016) นอกจากนี้ ร่างกายยังต้องใช้พลังงานมากขึ้นในการฟื้นฟูซึ่งจะทำให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตสำรองลดลง และเร่งการสังเคราะห์โปรตีน ส่งผลกระทบโดยตรงต่อสมรรถนะการผลิตของสัตว์

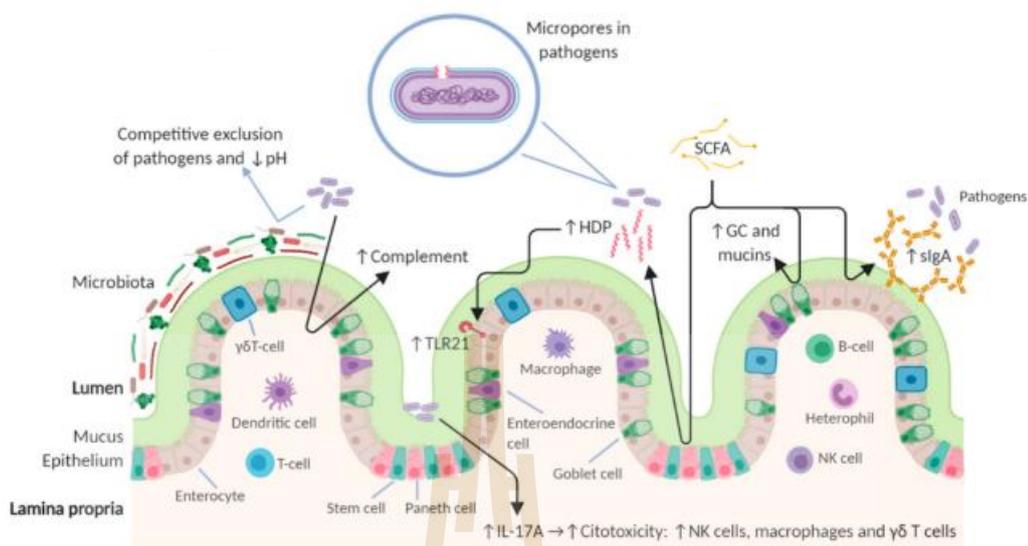
อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาคุณสมบัติความเป็นโพรบิโอติกของจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่ามีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค และกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์ ซึ่งมีคล้ายคลึงกับการเติมยาปฏิชีวนะ แต่โพรบิโอติกมีข้อได้เปรียบที่สำคัญในแง่ของการเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ ทำให้มีความปลอดภัยสูงจากปัญหาการดื้อยาปฏิชีวนะ และสารพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ นอกจากนี้ โพรบิโอติกยังช่วยส่งเสริมสุขภาพลำไส้และระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ จึงได้รับความนิยมอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เพื่อฟื้นฟูและเสริมสร้างสุขภาพของสัตว์ในระยะยาว



ภาพที่ 2.1 กลไกความเครียดทางภูมิคุ้มกันต่อระบบประสาท ต่อมไร้ท่อ และระบบภูมิคุ้มกัน
ที่มา: Niu et al. (2022)

2.2 จุลินทรีย์โพรไบโอติก

คำนิยามของ “โพรไบโอติก หรือ สารเสริมชีวนะ” คือ เชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งมีลักษณะไม่ก่อให้เกิดโรคและไม่เป็นพิษ เมื่อสัตว์กินเข้าไปแล้วจะมีผลในการลดจำนวนจุลินทรีย์ที่เป็นโทษและสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหาร ส่งผลให้สัตว์มีการเจริญเติบโตและมีผลผลิตที่ดีขึ้น โดยจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกมักอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก ซึ่งมีการศึกษาความปลอดภัยมาเป็นระยะเวลานานและพบว่าไม่มีคุณสมบัติก่อโรค นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกยังได้รับการศึกษาเพื่อนำมาใช้ในอาหารสัตว์มากขึ้น โพรไบโอติกมีกลไกการทำงานที่สำคัญ เช่น การเพิ่มกลไกการป้องกันของเยื่อบุผิวลำไส้ การเพิ่มการยึดเกาะกับเยื่อบุผนังลำไส้ การยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรค การกีดกันและขับเชื้อก่อโรคออกจากร่างกาย การผลิตสารต้านจุลินทรีย์ และการปรับภูมิคุ้มกันโรค (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 กลไกการทำงานของโพรไบโอติกในทางเดินอาหารของไก่
ที่มา: Tarradas et al. (2020)

2.3 ศักยภาพความเป็นโพรไบโอติกของ *L. salivarius* ในทางเดินอาหาร

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ที่พบในทางเดินอาหารของสัตว์หลายชนิด โดยอาศัยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA พบว่า *L. salivarius* ประกอบด้วย 25 สปีชีส์ ซึ่งสามารถจำแนกตามระบบนิเวศ สรีรวิทยา และแหล่งที่มาของจุลินทรีย์ (Neville et al. 2010) โดยสามารถพบหรือแยกได้จากทางเดินอาหารของไก่ สุกร และเป็ด เป็นต้น (Rondón et al., 2020) อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันสายพันธุ์ *L. salivarius* ได้รับการจำแนกใหม่ โดยเปลี่ยนจากสกุล *Lactobacillus* เป็นสกุลใหม่ เรียกว่า *Ligilactobacillus salivarius* (*L. salivarius*) ซึ่งประกอบด้วย 16 ชนิด การจำแนกใหม่นี้ช่วยให้การระบุสายพันธุ์และศึกษารูปแบบการดำรงชีวิตตามธรรมชาติที่ปรับตัวเข้ากับสัตว์มีกระดูกสันได้อย่างแม่นยำยิ่งขึ้น

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกต้องสามารถอยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหารส่วนต้น และสามารถเพิ่มจำนวนประชากรกรเพื่อทำหน้าที่ส่งเสริมสุขภาพของสัตว์ การประเมินคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของเชื้อจุลินทรีย์จึงเป็นขั้นตอนสำคัญ ประกอบด้วยหลายปัจจัย เช่น ความสามารถในการทนกรดและเกลือแร่ในทางเดินอาหาร ความสามารถในการยึดเกาะผนังทางเดินอาหาร ความไวต่อยาปฏิชีวนะ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค จากการรวบรวมเอกสาร พบว่า ผลการทดสอบในหลอดทดลองของเชื้อ *L. salivarius* ที่แยกได้จากบริเวณลำไส้เล็ก และซีกัมของไก่เนื้อ สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะความเป็นกรด (pH 3) และที่เกลือแร่ 2% (w/v)

(Mehrnaz et al, 2010) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. enteritidis* ได้ (ตารางที่ 2.2) ซึ่งเป็นการลดการก่อตัวของเชื้อโรค โดยอาศัยการผลิตกรดไขมันสายสั้น (SCFAs) ที่เพิ่มสูงขึ้น จากแบคทีเรียแลคติกที่อยู่รอดและเพิ่มจำนวนประชากรที่ผนังลำไส้ได้ (Wang et al. 2020)

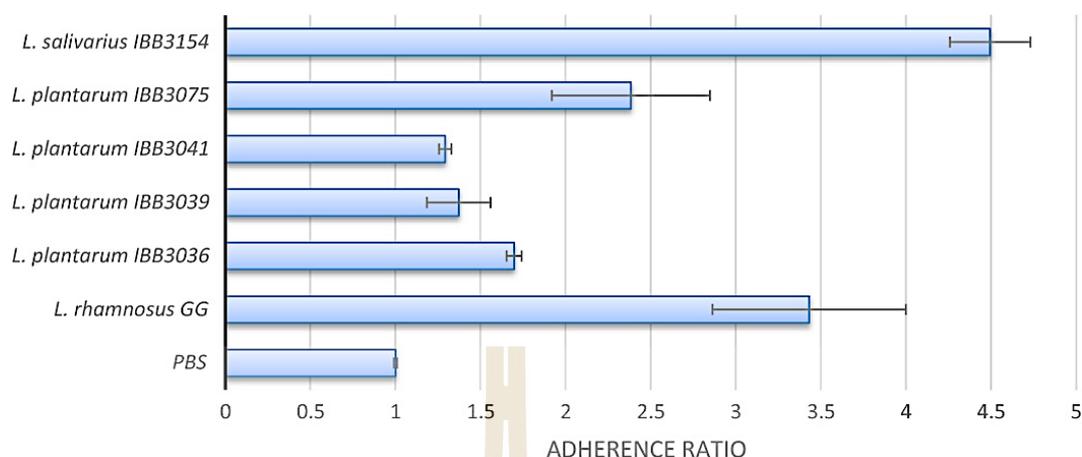
ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติจุลินทรีย์โพรไบโอติก *Ligilactobacillus salivarius*

Strains	characteristics			
	Bile salts 2%	Acidic pH 3	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>
C15	+	+	4+	3+
C3	+	+	4+	4+
C14	+	+	4+	4+
C5	+	+	3+	4+
C2	+	+	4+	4+

ที่มา: Mehrnaz et al. (2010)

หมายเหตุ: +, Intensity of inhibitory activity to *E. coli* and *S. enteritidis* are shown from + to 4+. C15 and C3, *L. salivarius* and *L. salivarius* originating from the small intestine, respectively; C14 and C5, *L. crispatus* and, *L. salivarius* originating from the duodenum, respectively and C2, *L. salivarius* originating from caeca.

จากการศึกษาของ Aleksandrzak-Piekarczyk et al. (2016) ที่ประเมินการยึดเกาะของ *Lactobacillus* 5 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (*L. rhamnosus* GG) ที่มีการยึดเกาะแน่นบน polystyrene (PS) แบบ microtiter พบว่าเชื้อ *L. plantarum* 3 สายพันธุ์ (IBB3036, IBB3039, IBB3041) ที่แยกได้จากนมดิบ มีการยึดเกาะที่ต่ำที่สุดในขณะที่ *L. plantarum* IBB 3075 มีการเกาะติดในระดับปานกลาง และ *L. salivarius* IBB3154 ที่คัดแยกได้จากไก่เนื้อ สามารถยึดเกาะได้ดีที่สุด (ภาพที่ 2.3) ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าสารควบคุม *L. rhamnosus* GG ที่มีการยึดติดสูงความสามารถในการยึดเกาะนี้อาจบ่งชี้ถึงความสามารถในการแก่งแย่งพื้นที่ยึดเกาะของจุลินทรีย์ก่อโรคบริเวณผนังลำไส้ได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ehrmann et al. (2002) ที่พบว่าเชื้อ *L. salivarius* TMW 1.992 ที่แยกได้จากซีกัม สามารถยึดเกาะบนเซลล์เพาะเลี้ยง Hep2 ได้ดีที่สุด (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 ผลของการยึดเกาะของแลคโตบาซิลลัสบน bare polystyrene microtiter plates

ที่มา: Aleksandrak-Piekarczyk et al. 2019)

ทั้งนี้กลไกที่ทำให้ *L. salivarius* สามารถยึดเกาะบนผนังลำไส้ได้อย่างแข็งแรงนั้นยังไม่ทราบได้แน่ชัด อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการทนต่อสภาพแวดล้อมของทางเดินอาหารส่วนต้น และการยึดเกาะกับผนังลำไส้ที่ตื้นนั้น จะช่วยให้ *L. salivarius* สามารถป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคมียึดเกาะและทำลายผนังลำไส้ของสัตว์ได้ ดังนั้นจึงมีแนวโน้มว่า *L. salivarius* สามารถอยู่รอดและเพิ่มจำนวนประชากรที่ผนังลำไส้ เพื่อทำหน้าที่ป้องกันและยับยั้งเชื้อการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค ซึ่งทำให้ *L. salivarius* มีศักยภาพที่น่าสนใจในการนำมาใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์เพื่อส่งเสริมสุขภาพและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต

หากพิจารณาไปที่คุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ *L. salivarius* ในสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า *L. salivarius* มีความสามารถในการปรับความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ผลิตสารต้านจุลชีพ กระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ในทางเดินอาหาร ส่งเสริมจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ มีการสร้างกรดไขมันสายสั้น เช่น acetic acid, propionic acid และ butyric acid ที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่า pH ลดลง (Zhang et al., 2013 and Chaves et al., 2017) การลดค่า pH นี้ช่วยปรับสภาพแวดล้อมภายในลำไส้ด้วยการลดแบคทีเรียก่อโรค (Jha et al., 2015) นอกจากนี้เมื่อสนใจไปที่ประเด็นด้านความปลอดภัย พบว่า โปรไบโอติก *L. salivarius* ได้รับการยอมรับในความปลอดภัย (Generally Recognized As Safe; GRAS) ในระดับสากล โดยฝ่ายรับรองจากองค์การอาหารและยาสหรัฐ (FDA) นอกจากนี้ยังได้รับการขึ้นทะเบียนรับรองเป็นสารเสริมชีวภาพแนะนำสำหรับเติมแต่งในอาหาร จากหน่วยงานตรวจสอบความปลอดภัยด้านอาหารแห่งสหภาพยุโรป (European Food Safety Authority; EFSA) และกระทรวงสาธารณสุขจีน (Ministry of Public Health of China) (Yang et al., 2024) และได้รับการขึ้นทะเบียนพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพ

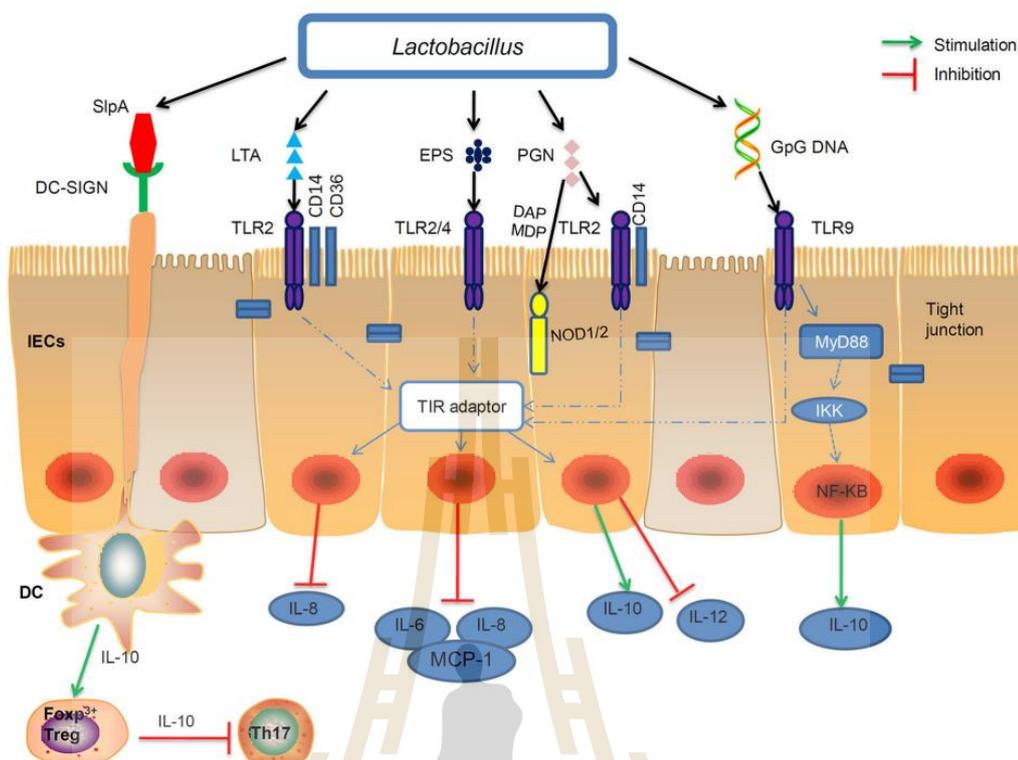
อาหารสัตว์ไทย (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2564) ด้วยคุณสมบัติคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของเชื้อ *L. salivarius* ประกอบกับความโดดเด่นด้านความปลอดภัยที่ผ่านการยอมรับจากทั้งในประเทศไทย และระดับสากล ส่งผลให้เชื้อโพรไบโอติก *L. salivarius* มีความน่าสนใจที่จะนำมาศึกษาในประเด็นด้านศักยภาพที่จำเพาะเจาะจงสำหรับอุตสาหกรรมปศุสัตว์ เช่น เพิ่มสมรรถนะการผลิตเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน ลดการอักเสบในสัตว์ เป็นต้น

2.4 โพรไบโอติก

โพรไบโอติกเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ที่ได้รับการยอมรับถึงคุณสมบัติการกระตุ้นการเจริญเติบโต และกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ และผ่านการทดสอบคุณสมบัติที่สำคัญสำหรับจุลินทรีย์โพรไบโอติก เช่น ความสามารถในการทนกรดและเกลือแร่ในทางเดินอาหาร ความไวต่อยาปฏิชีวนะ ความสามารถในการยึดเกาะผนังทางเดินอาหาร และความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการใช้เชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์ตาย (dead cell) รวมถึงส่วนใสที่ปราศจากตัวเซลล์ (cell free supernatant) ได้รับความสนใจเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากมีข้อได้เปรียบด้านความคงตัวของเชื้อ ด้วยความที่มีสถานะเป็นเชื้อที่ตายแล้ว ทำให้ยังสามารถใช้ประโยชน์คุณสมบัติของโพรไบโอติกไว้ได้ และการใช้ประโยชน์ในตัวสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่กังวลกับอัตราการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์

คำว่า “โพรไบโอติก” คือจุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์ตาย (dead cell) รวมถึงส่วนใสที่ปราศจากตัวเซลล์ (cell free supernatant) ซึ่งเป็นสารสารเมแทบอลิท์ที่ได้จากเชื้อโพรไบโอติกมีชีวิตที่ให้ผลดีต่อโฮสต์ในทั้งทางตรงหรือทางอ้อม (Zhong et al., 2022) และตั้งแต่ ปี ค.ศ. 2019 สมาคมนานาชาติทางวิทยาศาสตร์สำหรับโพรไบโอติกและพรีไบโอติก (ISAPP) ได้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกว่าเป็น "การเตรียมจุลินทรีย์ที่ไม่มีชีวิต หรือส่วนประกอบของจุลินทรีย์ที่ให้ประโยชน์ต่อโฮสต์" (Zhong et al., 2022) มีการใช้คำศัพท์หลายคำที่ใช้เรียกโพรไบโอติก เช่น Tyndallized probiotics, Heat-killed probiotics, Para-probiotics และ Bacterial lysates (Jurkiewicz al., 2018) แต่โดยส่วนใหญ่นิยมเรียกว่า “โพรไบโอติก”

จากการรวบรวมเอกสารพบว่าโพรไบโอติกที่มีการสนใจศึกษา และถูกใช้ทดสอบประสิทธิภาพมากที่สุดคือ Heat-killed cell รวมถึงองค์ประกอบของผนังเซลล์จุลินทรีย์ที่หลุดออกมาออกเซลล์จากการให้ความร้อน เช่น peptidoglycans (PGN), lipoteichoic acid (LTA), exopolysaccharides (EPS) และ surface layer proteins (SlpA) เป็นต้น โดยสารเหล่านี้สามารถจับกับผนังลำไส้ของสัตว์และกระตุ้นให้มีการสร้างสารเมือกมาปกคลุมผนังลำไส้ (ภาพที่ 2.4)



ภาพที่ 2.4 องค์ประกอบและกลไกที่เป็นไปได้ของโพรไบโอติกต่อผนังลำไส้ (Teame et al., 2020)

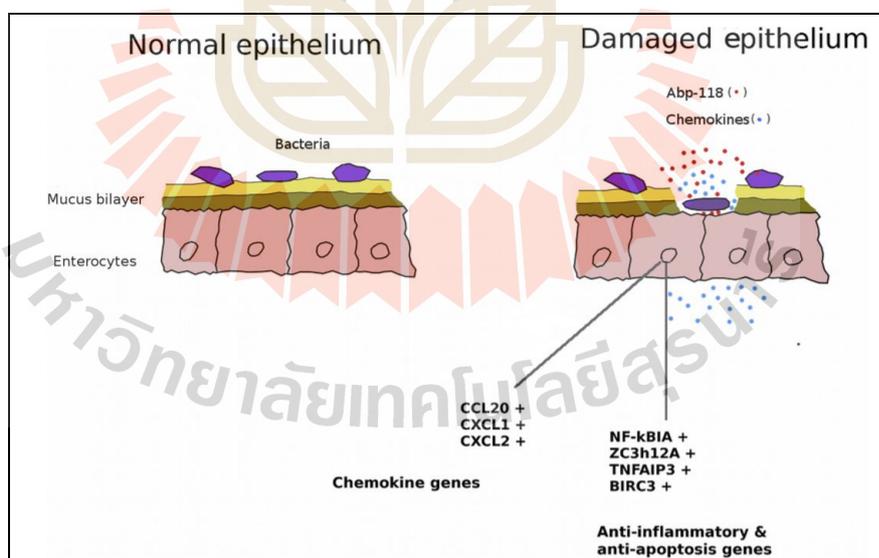
แม้ว่าจุลินทรีย์โพรไบโอติกในรูปแบบเซลล์ตาย (dead cell) จะไม่สามารถผลิตสารเมแทบอลิไทด์ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อโพรไบโอติกมีชีวิต แต่สามารถเสริมและกระตุ้นเซลล์เยื่อบุผิวในลำไส้ได้ เนื่องจากคุณสมบัติของส่วนประกอบของเซลล์ เช่น โปรตีน S-layer ในสารประกอบของผนังเซลล์จึงสามารถส่งเสริมสถานะสมดุลของเยื่อเมือกได้ กระตุ้นการผลิตเมือกที่เกี่ยวข้องกับการยกเว้นคู่แข่งของเชื้อโรคในลำไส้ด้วย อีกชนิดหนึ่งคือกรดไลโปโเทโคอิก (ไลโปโเทโคอิก) ซึ่งสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติเพื่อกระตุ้นไซโตไคน์ต้านการอักเสบได้เช่นกัน

2.5 บทบาทของ *L. salivarius* รูปแบบเซลล์มีชีวิตและรูปแบบเซลล์ตาย ต่อการยับยั้งการอักเสบในลำไส้

การใช้ *L. salivarius* ในสัตว์โดยส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่การปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกัน และลดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค โดยพบว่ามีการใช้มากในสุกรและสัตว์ปีก (Chaves et al., 2017) และเมื่อมุ่งเน้นไปที่บทบาทของเชื้อ *L. salivarius* ในทางสัตว์ปีก จะเห็นได้ว่ามีความสามารถในการลดการก่อตัวของเชื้อก่อโรคที่หลากหลาย ซึ่งเป็นผลมาจากกลไกการกีดกันแก่งแย่งกับเชื้อก่อโรค ปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกัน และการผลิตสารเมแทบอลิไทด์ เช่น กรดไขมันสายสั้น (SCFA) และแบคทีเรียโอซิน

(bacteriocins) เป็นต้น ซึ่งแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก มีกลไกในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน โดยทั่วไปมักออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ (Neville and O'Toole, 2010) โดยจะทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ และขัดขวางกระบวนการ proton motive force รวมทั้งรบกวนสมดุลของ pH ภายในเซลล์ ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออน และการสลายตัวของ ATP ทำให้เซลล์เกิดการตายในที่สุด (Mehrmaz et al., 2010)

นอกจากนี้ยังพบว่า *L. salivarius* UCC118 ที่แยกได้จากบริเวณลำไส้เล็กของมนุษย์ สามารถผลิต bacteriocin class II และ bacteriocin Abp118 (Corr et al., 2007) ซึ่งถูกควบคุมด้วยกลไกการสื่อสารระหว่างเซลล์ของแบคทีเรียที่เรียกว่า quorum-sensing (QS) กระตุ้นการผลิต Abp118 ได้สูงสุดในช่วงก่อนระยะที่แบคทีเรียมีจำนวนคงที่ (Stationary phase) เพื่อตอบสนองต่อการสะสมของเปปไทด์ที่กระตุ้นการอักเสบ ซึ่ง *L. salivarius* UCC118 จะเข้าจับกับเมือกบนเยื่อผนังลำไส้โดยอาศัย mucus binding proteins LspA และ LspC และเข้าจับกับเชื้อก่อโรคโดยอาศัยการหลั่งของ bacteriocin Abp118 เพื่อทำหน้าที่ปรับสภาพของผนังลำไส้เมื่อถูกทำลายจากเชื้อก่อโรค โดยอาศัยการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์บนชั้นเมือก (mucus layer) และกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันจากเยื่อผนังลำไส้ โดย *L. salivarius* UCC118 จะเหนี่ยวนำยีน chemokines (CCL20, CXCL1, CXCL2) และสารที่ลดการอักเสบ (anti-inflammatory) ในเซลล์เยื่อผนังลำไส้ (ภาพที่ 2.5) (O'Callaghan et al. 2012) ทำให้สามารถฟื้นคืนสภาพของเยื่อผนังลำไส้หลังจากถูกทำลายได้



ภาพที่ 2.5 กลไกการป้องกันเชื้อก่อโรคของเชื้อ *L. salivarius* บนเยื่อผนังลำไส้ของ (O'Callaghan et al., 2012)

กลไกการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการยึดเกาะเยื่อบุผนังลำไส้ของโพรไบโอติก ซึ่งจุลินทรีย์ *Lactobacillus* จะทำงานร่วมกับเยื่อบุผนังลำไส้และเยื่อเมือก โดยเยื่อบุผนังลำไส้มีการหลั่งเมือก (mucus) ที่มีองค์ประกอบหลักคือ ไกลโคโปรตีน ทำหน้าที่ป้องกันการยึดเกาะของจุลินทรีย์ก่อโรค (Sureshkumar et al., 2021) มีรายงานว่า *L. salivarius* มีการผลิต mucus binding proteins LspA และ LspC จะเกาะจับกับเมือกบนเยื่อบุผนังลำไส้ (O'Callaghan et al. 2012) โดยกลไกการยึดเกาะของแบคทีเรียแลคติกสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งแบบจำเพาะ (receptor-specific blind) แบบใช้แรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals force) แบบใช้ประจุ และการจับกันของเซลล์กับตัวรับแบบปฏิสัมพันธ์แบบไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) ซึ่งโดยทั่วไปผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีลักษณะไม่ชอบน้ำ (cell surface hydrophobic) นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถผลิตโปรตีนบางชนิดออกมาบนผนังเซลล์ ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่มที่อยู่ภายนอกเซลล์ (extracellular matrix molecule) เช่น คอลลาเจน (collagen) ไฟโบเนกติน (fibronectin) และไวโทรเนกติน (vitronectin) โดยโปรตีนเหล่านี้จะถูกใช้ในการยึดเกาะกับเยื่อบุผนังลำไส้ได้ (Jahromi et al., 2016)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

ใช้ไก่เนื้อลูกผสมทางการค้าพันธุ์ Ross 308 อายุ 1 วัน เพศผู้ จำนวน 90 ตัว โดยสุ่มแบ่งไก่เนื้อออกเป็น 9 กลุ่ม ๆ ละ 10 ซ้ำ ๆ ละ 1 ตัว ไก่ทุกตัวได้รับการติดแท็กเบอร์ และเลี้ยงในกรงปล่อยพื้นแบบขังรวม ภายในกรงมีถาดให้อาหารและถาดให้น้ำ และใช้แกลบเป็นวัสดุรองพื้น มีระยะเวลาในการทดลอง 14 วัน ไก่ทุกตัวได้รับน้ำและอาหารอย่างเต็มที่ตลอดการทดลอง (*ad libitum*) และได้รับวิตามินในน้ำดื่มเพื่อป้องกันความเครียดในช่วง 3 วันแรก โดยมีการควบคุมอุณหภูมิภายในโรงเรือนไว้ที่ 33°C ตั้งแต่ไก่อายุ 1 วัน จนถึง 7 วัน เพื่อกกลูกไก่ และค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลงเหลือ 23°C ไก่ทุกตัวได้รับวัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลและโรคหลอดลมอักเสบติดต่อกันที่อายุ 7 วัน

การทดลองนี้ได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ตามใบอนุญาตให้ใช้สัตว์ เลขที่ SUT-IACUC-0014/2023

3.2 การเตรียมตัวอย่างจุลินทรีย์เซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย

กระบวนการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นด้วยการเชื้อเชื้อ *L. salivarius* I203 จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (*Lactobacillus* MRS Broth) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์จุลินทรีย์ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วที่ 5,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ phosphate-buffered saline (PBS) ที่ pH 7.2 จำนวน 2 ครั้ง และนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาละลายใน PBS อีกครั้ง เพื่อปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้มีค่า optical density ที่มีความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) เท่ากับ 1.00 จากนั้นทำการถ่ายเชื้อลงในถังหมักขนาดความจุ 5 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS จำนวน 3 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิระหว่างการเลี้ยงเชื้อให้คงที่ที่ 37°C รักษาระดับ pH ให้คงที่ (pH 6.5) พร้อมกับกวนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยความเร็ว 400 rpm และให้อากาศปลอดเชื้อซึ่งผ่านการกรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอนเมตรในอัตราการไหล 0.5 vvm ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ เมื่อครบเวลาการเลี้ยงเชื้อที่ 12–18 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์จุลินทรีย์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย PBS pH 7.2 จำนวน 2 ครั้ง และนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปละลายในน้ำกลั่น เพื่อปรับความเข้มข้นของจุลินทรีย์ให้ได้ระดับประมาณ 10^7 10^8 และ

10^9 CFU/mL จากนั้นนำหัวเชื้อที่เตรียมไว้ไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) เพื่อคงสภาพความมีชีวิต

การเตรียมจุลินทรีย์เซลล์ตาย โดยนำเซลล์มีชีวิตที่ได้ไปผ่านกระบวนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นระยะเวลา 30 นาที เพื่อยับยั้งการเจริญและทำลายความสามารถในการมีชีวิตของเซลล์ จุลินทรีย์อย่างสมบูรณ์ หลังจากนั้นจึงนำเชื้อที่ผ่านความร้อนไปเข้าสู่กระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

3.3 การป้อนจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 การเหนี่ยวนำการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ และการเก็บตัวอย่าง

ไก่เนื้อในแต่ละกลุ่มการทดลองจะได้รับการป้อน จุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายทางปาก (oral administration) ที่ระดับ 10^7 10^8 และ 10^9 CFU/ตัว/วัน กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารเสริมจะได้รับการป้อนด้วยสารละลาย PBS (ปริมาณ 1 มล./ตัว/วัน) เป็นระยะเวลา 14 วัน (ตั้งแต่อายุ 1–14 วัน) เมื่อไก่เนื้ออายุครบ 14 วัน ไก่กลุ่มการทดลองที่ 2–9 จะได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบโดยการฉีดไลโปโพลีแซคคาไรด์ ที่สกัดจากผนังเซลล์ของ *E. coli* O55:B5 (L4005, Sigma) ฉีดเข้าบริเวณช่องท้อง (intraperitoneal injection) ปริมาณ 500 ไมโครกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (Yousefi et al., 2021) หลังจากการฉีดครบ 24 ชั่วโมง ไก่เนื้อจะได้รับการทำให้สลบด้วยโคลโรฟอร์ม จากนั้นทำการเชือดเพื่อผ่าท้องและเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากลำไส้เล็กส่วนกลางและส่วนปลาย โดยเก็บในหลอดที่บรรจุสารฟอร์มอลิน 10% สำหรับการวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา (เช่น ความสูงวิลไล ความลึกคริปต์ และอัตราส่วนระหว่างความสูงของวิลไลกับความลึกของคริปต์) นอกจากนี้ ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากลำไส้เล็กส่วนเดียวกันใส่ในกล่องแช่ไนโตรเจนเหลว เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยเฉพาะกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารไซโตไคน์ชนิดกระตุ้นการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) ยับยั้งการอักเสบ (anti-inflammatory cytokines) และยีนที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์ของเยื่อบุลำไส้ (intestinal barrier integrity) โดยใช้เทคนิค real-time PCR จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างสิ่งย่อยจากซีกัมใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างที่ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่ปลอดเชื้อ แล้วแช่ในกล่องบรรจุไนโตรเจนเหลว ก่อนเก็บรักษาไว้ที่ อุณหภูมิ -80°C เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบสารเมแทบอลิท์ ได้แก่ กรดไขมันสายสั้น กรดแลคติก และแอมโมเนีย ในสีก่องที่บรรจุ

3.4 อาหารและกลุ่มการทดลอง

1. ไก่ทุกกลุ่มการทดลองได้รับอาหารที่มีระดับของโปรตีนและพลังงานเท่ากัน โดยมีองค์ประกอบของโภชนาที่เพียงพอต่อความต้องการของไก่เนื้อ ตามคำแนะนำของ NRC (1994) และมาตรฐานสายพันธุ์ Ross 308 (2022) ซึ่งองค์ประกอบของวัตถุดิบและปริมาณโภชนาของสูตรอาหาร

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบและปริมาณโภชนะในสูตรอาหารพื้นฐาน

Item	Starter (1-10 d)	Grower (11-14d)
Ingredients (%)		
Corn	56.28	58.10
Soybean meal, 44% CP	30.40	28.75
Corn gluten meal, 60% CP	6.21	5.30
Palm oil	1.80	3.16
Limestone	1.49	1.34
Monocalcium phosphate	1.62	1.45
Salt	0.50	0.49
DL-methionine	0.31	0.27
L-lysine	0.47	0.37
L-threonine	0.20	0.14
L-arginine	0.22	0.13
Premix ¹	0.50	0.50
Calculated nutrients (%)		
ME (kcal/kg)	3,000	3,100
Digestible methionine	0.65	0.59
Digestible methionine + cysteine	0.96	0.88
Ingredients (%)		
Digestible methionine + cysteine	0.96	0.88
Digestible lysine	1.29	1.17
Digestible threonine	0.88	0.79
Digestible valine	0.91	0.86
Digestible arginine	1.39	1.24
Calcium	0.96	0.87
Available phosphorus	0.48	0.44
Analyzed composition		
Dry matter	89.26	89.30
Crude protein	23.06	21.53
Crude fat	4.06	5.44
Ash	2.62	2.54
Fiber	3.49	3.40

¹Vitamin-mineral premix provided the following per kg: vitamin A 3,000,000 IU; vitamin D 6,000,000 IU; vitamin E 5,000 IU; vitamin K 1,000 mg; thiamine 500 mg; riboflavin 1,400 mg; pantothenic acid 2,208 mg; niacin 7,000 mg; pyridoxine 900 mg; biotin 3 mg; folic acid 200 mg; choline 50,000 mg; Fe 16,000 mg; Cu 320 mg; Zn 9,000 mg; Mn 12,000 mg; Se 30 mg.

ทดลองพื้นฐาน แสดงในตารางที่ 3.1 ประกอบด้วย 2 ระยะ คือ 1) ระยะไก่อเล็ก สำหรับไก่อเนื้อช่วงอายุ 1-10 วัน 2) ระยะไก่อรุ่น สำหรับไก่อเนื้อช่วงอายุ 11-14 วัน โดยกลุ่มการทดลองทั้ง 9 กลุ่มประกอบด้วย

- กลุ่มที่ 1 อาหารสูตรควบคุม บ้อน PBS และไม่ฉีด *E. coli* LPS
- กลุ่มที่ 2 อาหารสูตรควบคุมลบ (negative control) บ้อน PBS
- กลุ่มที่ 3 อาหารสูตรควบคุมบวก (positive control) เสริมยาปฏิชีวนะ zinc bacitracin
- กลุ่มที่ 4 Live cell *L. Salivarius* I203 ระดับ 10^7 CFU/ตัว/วัน
- กลุ่มที่ 5 Live cell *L. salivarius* I203 ระดับ 10^8 CFU/ตัว/วัน
- กลุ่มที่ 6 Live cell *L. salivarius* I203 ระดับ 10^9 CFU/ตัว/วัน
- กลุ่มที่ 7 Dead cell *L. salivarius* I203 ระดับ 10^7 CFU/ตัว/วัน
- กลุ่มที่ 8 Dead cell *L. salivarius* I203 ระดับ 10^8 CFU/ตัว/วัน
- กลุ่มที่ 9 Dead cell *L. salivarius* I203 ระดับ 10^9 CFU/ตัว/วัน

3.5 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.5.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของลำไส้ (intestinal morphology)

ตัวอย่างลำไส้ที่เก็บไว้ในหลอดบรรจุสายละลาย บัฟเฟอร์ฟอร์มอลิน 10% ถูกนำไปผ่านกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อด้วยเครื่องเตรียมชิ้นเนื้อแบบอัตโนมัติ (automatic tissue processor) ตามขั้นตอนมาตรฐานทางพยาธิวิทยา จากนั้นจึงฝังชิ้นเนื้อ ในบล็อกพาราฟิน โดยใช้เครื่องฝังชิ้นเนื้อ (embedding center) และปล่อยให้บล็อกพาราฟินที่มีชิ้นเนื้อฝังอยู่แข็งตัวบนแท่นทำความเย็น ภายหลังจากฝังชิ้นเนื้อ บล็อกพาราฟินจะถูกตัดบาง ด้วยเครื่องมือไมโครทอม (microtome) ให้ได้ชิ้นเนื้อที่มีความหนา 4 ไมโครเมตร ชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดจะถูกลอยในอ่างลอยเนื้อเยื่อ (tissue floating bath) ที่อุณหภูมิ 45°C และนำขึ้นติดบนสไลด์ชนิดพอลิไซน (polysinecoated slides) โดยการซ้อนเนื้อเยื่อให้แนบสนิทกับสไลด์ จากนั้นทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อเนื้อเยื่อแห้งสมบูรณ์ สไลด์จะถูกนำไปย้อมสีด้วยเทคนิค ฮีมาโตซิลินและอีโอซิน (hematoxylin and eosin, H & E stain) เพื่อตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ โดยใช้กล้องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า (Objective 10X) เพื่อประเมินค่าต่าง ๆ ได้แก่ ความสูงของวิลไล (villi height) ความลึกของคริปต์ (crypt depth) และอัตราส่วนระหว่างความสูงของวิลไลกับความลึกของคริปต์ (villi height: crypt depth ratio) ในลำไส้

3.5.2 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโรค (gene expression of immune response)

วิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันประกอบด้วย การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (pro-inflammatory cytokines) และไซโตไคน์ที่ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory cytokines) ได้แก่ *TNF- α* *IL-1 β* และ *IL-4*

รวมถึงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของผนังลำไส้ ได้แก่ *OCLN* *CLDN1* และ *JAM2* ด้วยเทคนิค real-time PCR ดัดแปลงจากวิธีการของ Tsukagoshi et al. (2020) ตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและเยื่อบุลำไส้เล็กส่วนกลาง ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C จะถูกนำมาสกัดเพื่อแยก total mRNA และประเมินคุณภาพของ RNA ด้วยอัตราส่วนการดูดกลืนแสง ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่อง NanoVue Plus Nano Drop spectrophotometer (GE Healthcare, USA) และทำการสกัด DNA ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป จากนั้นใช้ DNA เป็นต้นแบบสำหรับการทำ real-time PCR Light Cycler[®] 480 SYBR Green I Master และ primers ที่จำเพาะต่อ pro-inflammatory cytokine anti-inflammatory cytokines และ primers ที่จำเพาะต่อ *OCLN* และ *CLDN1* ของไก่ โดยใช้ β -actin และ GAPDH เป็นยีนควบคุมภายใน (housekeeping genes) โดยมีปริมาณรวมของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาจำนวน 10.0 ไมโครลิตร ประกอบด้วย SYBR Green Master Mix จำนวน 5.0 ไมโครลิตร forward primer และ reverse primer ที่ความเข้มข้น 10 μM อย่างละ 0.4 ไมโครลิตร ตัวอย่าง DNA จำนวน 2.0 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น nuclease free water (ใส่ให้ได้ปริมาตรรวม 10.0 ไมโครลิตร) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ และในการทำปฏิกิริยาจะมีตัวควบคุมลบ (negative control) โดยใช้น้ำกลั่น nuclease free water แทน DNA ต้นแบบ

ตารางที่ 3.5.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR

Target gene	Primer sequence (5'-3')	Accession No.	Size	References
<i>TNF-α</i>	F: CCCATCCCTGGTCCGTAAC R: ATACGAAGTAAAGGCCGTC	MF000729.1	77	Froebel, Calik, Emami, Blue, and Dalloul. (2024)
<i>IL-1β</i>	F: GATCCGGCAGATGGTGATAA R: AGGATGAGGTGCATGGTGAT	NM_204524.2	64	Froebel et al. (2024)
<i>IL-4</i>	F: CGCTGTCACCGCTTCTTCA R: CGTCTCCTTGATCTGCTTGATG	NM_001004414.4	63	
<i>OCLN</i>	F: CCGTAACCCCGAGTTGGAT R: ATGAGGCGGTCGTTGATG	NM_205128.1	214	Alhotan, Al Sulaiman, Alharthi, and Abudabos. (2021)
<i>CLDN1</i>	F: ATGACCAGGTGAAGAAGATGC R: TGCCCAGCCAATGAAGAG	NM_001013611.2	126	Liu H. et al. (2024)
<i>JAM2</i>	F: AGCCTCAAATGGGATTGGATT R: CATCAACTTGCATTCGCTTCA	NM_001006257	59	Teng, Choi, Yadav, Tompkins, and Kim. (2021)
<i>MUC2</i>	F: TGAGTCAGGCATAAATCGTGT R: CAGGTCTAAGTCGGGAAGTGTA	XM_421035	78	Liu W.-C. et al. (2022)
<i>GAPDH</i>	F: GGTGGTGCTAAGCGTGTTAT R: ACCTCTGCCATCTCTCCACA	KO1458	264	Orso et al. (2022)
<i>β-actin</i>	F: TTGGTTTGTCAAGCAAGCGG R: CCCCCACATACTGGCACTTT	NM_205518.1	100	

3.5.3 การผลิตกรดไขมันสายสั้น กรดแลคติก และแอมโมเนียในซีกัม (SCFAs, lactic acid and ammonia production)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันสายสั้น (acetic acid, propionic acid และ butyric acid) และกรดแลคติก ในตัวอย่างสิ่งย่อยจากซีกัม โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Mookiah et al. (2014) โดยชั่งตัวอย่างสิ่งย่อยจากซีกัมจำนวน 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองเติมสารละลาย (24% meta-phosphoric acid ใน 1.5 M H₂SO₄) 1 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:1) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที แล้วเก็บส่วนใสด้านบน นำไปกรองผ่าน nylon syringe filter จากนั้นทำการเติม 4-methylvaleric acid (Alfa Aesar, United Kingdom) เพื่อเป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ตัวอย่างที่ได้ถูกนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas

chromatography (GC, Agilent 7890B, Agilent Technologies, USA) โดยใช้คอลัมน์ CP-Sil 5 CB (0.32 mm x 25 m fused silica capillary column) และตรวจวัดด้วย flame-ionization detector (FID) การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันสายสั้นใช้กราฟเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานภายนอก (external standard) ได้แก่ ชุดสารมาตรฐานผสมกรดไขมันสายสั้น C2-C7 (Supelco, USA) สำหรับการวิเคราะห์กรดแลคติก ใช้ลิเทียมแลคเตท (lithium lactate, Alfa Aesar, United Kingdom) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบ

การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียดำเนินการตามวิธีการของ Willis et al. (1996) โดยชั่งตัวอย่างสิ่งย่อยจากซีกัมจำนวน 175 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำละลาย 0.5% Li₂CO₃ จำนวน 25 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมน้ำ salicylate reagent จำนวน 4 มิลลิลิตร และสาร hypochlorite จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 685 นาโนเมตรด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาไมโครเพลต (microplate reader) และคำนวณหาปริมาณแอมโมเนีย โดยเปรียบเทียบกับกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของแอมโมเนีย (ammonia calibration curve)

3.5.4 การประเมินโครงสร้างของผนังเซลล์ *L. salivarius* I203 ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) micro-spectroscopy

เตรียมเซลล์ *L. salivarius* I203 โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (PBS) และแบ่งออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปวิเคราะห์โดยตรง (เซลล์มีชีวิต) และอีกส่วนนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (เซลล์ที่ถูกฆ่าด้วยความร้อน) จากนั้นปรับความขุ่นของทั้งสองกลุ่มให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 1.0 ทำการวัดสเปกตรัมอินฟราเรดโดยใช้เครื่องสเปกโตรมิเตอร์ Bruker Tensor 27 (Global source) แหล่งกำเนิดแสงที่เชื่อมต่อกับกล้องจุลทรรศน์อินฟราเรด (Hyperion 2000, Bruker Optick GmbH, Ettlin-Gen, Germany) โดยใช้เลนส์วัตถุ 36x และหัววัด Mercury Cadmium Telluride (MCT) ในช่วงความยาวคลื่น 4000 ถึง 800 cm⁻¹ ทำการวัดในโหมดส่งผ่าน โดยใช้ช่องรับแสงขนาด 20x20 μm² ด้วยความละเอียดเชิงสเปกตรัม 4 cm⁻¹ และทำการสแกนซ้ำจำนวน 64 ครั้ง โดยใช้ซอฟต์แวร์ OPUS 7.5 เก็บข้อมูลสเปกตรัม (Bruker Optics Ltd, Ettlingen, Germany) และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม UnscramblerX 10.5 และ MCT ทำการปรับแก้สเปกตรัมด้วยซอฟต์แวร์ OPUS 7.5 โดยปรับแก้การรบกวนจากชั้นบรรยากาศ (atmospheric compensation) และเส้นฐานแบบ Rubber Band (rubber band baseline correction) จากนั้นส่งออกข้อมูลไปยังโปรแกรม Unscrambler X 10.5 เพื่อทำการวิเคราะห์ข้อมูลแบบหลายตัวแปร (multivariate analysis) ซึ่งรวมถึงการแปลงอนุพันธ์อันดับสอง

แบบ Savitzky-Golay (Savitzky-Golay second derivative transformation) รวมถึงการปรับมาตรฐาน EMSC (Extended Multiplicative Signal Correction: EMSC normalization) และการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal Component Analysis: PCA) โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน ถูกตรวจสอบโดยการวิเคราะห์อย่างละเอียดในบริเวณ Amide I ($1700-1600\text{ cm}^{-1}$) โดยใช้การประมาณเส้นโค้ง (curve fitting) ด้วยฟังก์ชันผสมแบบ Gaussian-Lorentzian เพื่อหาปริมาณร้อยละของโครงสร้าง α -helix, β -sheet, β -turn และ random coil

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดได้รับการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variances, ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS software เวอร์ชัน 18 (SPSS, 2010) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Tukey's HSD และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองด้วย Orthogonal contrasts โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ การเปรียบเทียบแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ 1) กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะปกติและกลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะกระตุ้นให้เกิดการอักเสบที่ได้รับการป้องกัน *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย (control vs. LC-LSI203 and DC-LSI203); 2) กลุ่มที่กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะกระตุ้นให้เกิดการอักเสบที่ปราศจากการเสริมยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ได้รับการป้องกัน *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย (NC VS LC-LSI203 and DC-LSI203); 3) กลุ่มที่กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะกระตุ้นให้เกิดการอักเสบที่ได้รับการเสริมยาปฏิชีวนะ และกลุ่มที่ได้รับการป้องกัน *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย (PC VS LC-LSI203 and DC-LSI203) และ 4) กลุ่มที่เลี้ยงภายใต้สภาวะกระตุ้นให้เกิดการอักเสบที่ได้รับการป้องกัน *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์มีชีวิตและกลุ่มที่ได้รับการป้องกัน *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์ตาย (LC-LSI203 VS DC-LSI203)

3.7 สถานที่ทำการทดลอง

งานสัตว์ปีกฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี อาคารเครื่องมือ 10 ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์กระเพาะเดี่ยว อาคารเครื่องมือ 14 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติก *L. salivarius* I203 ต่อน้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และการทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์ของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์

ผลของจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ต่อน้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะ และการทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์ของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ แสดงในตารางที่ 4.1 เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยกลุ่มทดลองด้วยวิธี Orthogonal contrasts พบว่าไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับการป้อนจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิต และรูปแบบเซลล์ตาย มีน้ำหนักตัวที่อายุ 7 วัน 14 วัน และ 15 วัน (หลังได้รับไลโปโพลีแซคคาไรด์ครบ 24 ชั่วโมง) สูงกว่าไก่เนื้อกลุ่มควบคุมลบ (ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์) ($P < 0.05$) นอกจากนี้ไก่กลุ่มที่ได้รับการป้อนจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายมีน้ำหนักตัวที่อายุ 14 และ 15 วัน สูงกว่ากลุ่มควบคุม และควบคุมลบ ($P < 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามน้ำหนักตัวของไก่ที่ได้รับเชื้อทั้งสองรูปแบบไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยวิธี Tukey พบว่าที่อายุ 7 วัน ไก่กลุ่มที่ได้รับการ *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตที่ระดับ 1×10^7 CFU/ตัว/วัน และรูปแบบเซลล์ตายที่ระดับ $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ CFU/ตัว/วัน มีน้ำหนักตัวสูงกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) และไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และกลุ่มควบคุมบวก ($P > 0.05$) ที่อายุ 14 วัน พบว่าการป้อน *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์มีชีวิตทุกระดับ ($1 \times 10^7 - 1 \times 10^9$ CFU/ตัว/วัน) และรูปแบบเซลล์ตายที่ระดับ 1×10^7 และ 1×10^8 CFU/ตัว/วัน สามารถเพิ่มน้ำหนักตัวของไก่เนื้อได้มากกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ที่อายุ 15 วัน (หลังได้รับ ไลโปโพลีแซคคาไรด์ ครบ 24 ชั่วโมง) พบว่า *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์ตายที่ระดับ 1×10^7 และ 1×10^8 CFU/ตัว/วัน ยังสามารถรักษา น้ำหนักตัวของไก่ได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$)

สำหรับน้ำหนักของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (ตารางที่ 4.1) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยกลุ่มทดลองด้วยวิธี Orthogonal contrasts พบว่าไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับการป้อน *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย มีค่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มควบคุมบวก ($P < 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามไก่ที่ได้รับเชื้อทั้งสองรูปแบบมีน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยวิธี Tukey พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับการ *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์ตายที่ระดับ $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ CFU/ตัว/วัน มีน้ำหนักตับ

สูงสุด และแตกต่างจากกลุ่มควบคุมบวก ($P < 0.05$) สำหรับค่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของเบอร์ซ่าของไก่กลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* I203 มีน้ำหนักน้อยกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมบวก ($P > 0.05$) โดย *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์ตาย มีผลทำให้น้ำหนักสัมพัทธ์ของเบอร์ซ่าน้อยกว่ารูปแบบเซลล์มีชีวิต ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยวิธี Tukey พบว่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของเบอร์ซ่าในไก่กลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์มีชีวิตที่ระดับ 1×10^9 CFU/ตัว/วัน มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตาม ไก่เนื้อที่ได้รับ การป้อนโปรไบโอติก *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิต และรูปแบบเซลล์ตาย ในทุกระดับนั้นไม่ส่งผลกระทบต่อค่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของม้าม ($P > 0.05$)

สำหรับผลของการป้อนจุลินทรีย์โปรไบโอติก *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายต่อการทำงานของไลโซไซม์ในซีรัม (ตารางที่ 4.1) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยกลุ่มทดลองด้วยวิธี Orthogonal contrasts พบว่าไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับการป้อนโปรไบโอติก *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิต และรูปแบบเซลล์ตาย สามารถเพิ่มปริมาณไลโซไซม์ในซีรัมได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมบวก ($P > 0.05$) ทั้งนี้ *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์ตายสามารถเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์ได้สูงกว่ารูปแบบเซลล์มีชีวิต ($P < 0.05$)

ความเครียดทางภูมิคุ้มกัน (immunological stress) ส่งผลให้เชื้อก่อโรคสามารถก่อตัว และเจริญอยู่ได้ในลำไส้ ก่อให้เกิดภาวะการอักเสบของลำไส้ ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์เนื้อเยื่อและเกิดการอักเสบเรื้อรัง นำไปสู่สภาวะอุนภูมิในร่างกายสูง ลดการกินได้ และน้ำหนักลดลง (Berghman et al., 2016) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นไก่อให้เกิดการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ส่งผลให้ไก่มีน้ำหนักตัวและการทำงานของไลโซไซม์ในซีรัมลดลง อีกทั้งยังพบว่ามีน้ำหนักของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน (ตับ และเบอร์ซ่า) เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากกระบวนการปรับตัวของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยในระหว่างการทดลองนี้มีการฉีดเอนโดทอกซิน (ไลโปโพลีแซคคาไรด์) เข้าสู่ช่องท้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลให้ไลโปโพลีแซคคาไรด์ ดูดซึมเข้าสู่หลอดเลือดดำ (hepatic portal vein) ซึ่งเป็นแหล่งรวมของเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune cells) เช่น เซลล์มาโครฟาจ (macrophages) เซลล์เดนดริติก (dendritic cells) และเซลล์เฮเทอโรฟิล (heterophilic cell) ทำหน้าที่ในการตรวจจับและกำจัดสารพิษภายในร่างกาย ผ่านการหลั่งเอนไซม์ไลโซไซม์ ที่มีบทบาทในการทำลายผนังเซลล์ของเชื้อก่อโรค อย่างไรก็ตาม การลดลงของไลโซไซม์ในซีรัมของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์อาจบ่งชี้ว่าไก่อับเอนโดทอกซินเข้าสู่ร่างกายในปริมาณมากกว่าปกติ ซึ่งกระตุ้นให้เซลล์ภูมิคุ้มกัน (เซลล์มาโครฟาจ เซลล์เดนดริติก และเซลล์เฮเทอโรฟิล) เข้ายึดเกาะและถูกทำลายร่วมกับสารพิษในกระแสเลือด ดังนั้น จึงส่งผลต่อปริมาณการทำงานของไลโซไซม์ในซีรัมของไก่เนื้อที่ได้รับไลโปโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งมีปริมาณลดลงในระหว่างกระบวนการนี้

น้ำหนักรวมของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ตับ ม้าม และเบอริซาร์ ซึ่งจัดเป็นอวัยวะในระบบภูมิคุ้มกันหรืออวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organs) ที่มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานตามปกติของเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune cells) โดยเฉพาะอย่างยิ่งตับ ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการกำจัดแอนติเจนที่มาจากลำไส้ จากผลการทดลองพบว่า ไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับการป้องกัน *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย มีค่าน้ำหนักอวัยวะของตับที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมบวก ซึ่งอาจเป็นผลจากการตอบสนองต่อสารพิษจากแอนติเจนที่กระตุ้นให้เกิด การอักเสบที่สูง การอักเสบดังกล่าวส่งผลให้เซลล์คูปเฟอร์ (Kupffer cells) ผลิตโมเลกุลอนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) ที่สามารถทำลายเซลล์ต่าง ๆ รวมถึงเซลล์ของเนื้อเยื่อตับ ส่งผลทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์คูปเฟอร์ ผ่านกระบวนการขยายตัวของเซลล์ตับ เพื่อป้องกันความเสียหายของเนื้อเยื่อตับไม่ให้ลุกลามรุนแรงขึ้น ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการรายงานของ Chen et al. (2024) ซึ่งพบว่า ไก่เนื้อที่อยู่ในภาวะอักเสบจากการได้รับสารพิษไลโปโพลีแซคคาไรด์ มีน้ำหนักอวัยวะของอวัยวะตับและม้ามเพิ่มสูงขึ้น

ขณะเดียวกันการป้องกันจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายภายใต้ภาวะอักเสบจากการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ พบว่ามีประสิทธิภาพในการปรับปรุงน้ำหนักอวัยวะของต่อมเบอริซาร์ให้อยู่ในระดับใกล้เคียงกับไก่เนื้อที่อยู่ในสภาวะปกติ การลดขนาดของอวัยวะภูมิคุ้มกันดังกล่าว อาจบ่งชี้ถึงภาวะการอักเสบที่ลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากคุณสมบัติในการปรับสมดุลภูมิคุ้มกันของ *L. salivarius* I203 ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Yu et al. (2022) ที่พบว่า *Bacillus coagulans* และ *L. plantarum* มีศักยภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต เพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกัน และลดภาวะการอักเสบในไก่เนื้อที่ได้รับไลโปโพลีแซคคาไรด์ โดยมีหลักฐานสนับสนุนว่าโพรไบโอติกสามารถฟื้นฟูโครงสร้างฮีสโตโลยีของต่อมเบอริซาร์ให้กลับเข้าสู่สภาวะปกติ ลดการตายของเซลล์ และกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของลิมโฟไซต์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการสร้างภูมิคุ้มกัน Li et al. (2015) รายงานการเสริม *B. amyloliquefaciens* ในอาหารสามารถลด น้ำหนักอวัยวะของเบอริซาร์ ในไก่เนื้ออายุ 21 วัน ที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ Zhang et al. (2024) รายงานว่าการเสริมจุลินทรีย์ *L. acidophilus* ส่งผลให้น้ำหนักตัวของไก่เนื้ออายุ 14 วัน เพิ่มขึ้นภายใต้สภาวะการอักเสบจากไลโปโพลีแซคคาไรด์ นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำหนักต่อมเบอริซาร์ที่ลดลงจากการป้องกันจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและรูปแบบเซลล์ตาย มีความสัมพันธ์กับการทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์ และการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว ซึ่งบ่งชี้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวมีศักยภาพในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ส่งเสริมสุขภาพ และการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ อย่างไรก็ตาม แม้ว่า *L. salivarius* I203 ทั้งสองรูปแบบ จะมีผลเชิงบวกต่อสุขภาพโดยรวมและการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน แต่ยังไม่สามารถการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักของตับที่เกิดจากภาวะการอักเสบฉับพลันอันเนื่องมาจากการถูกกระตุ้นโดยไลโปโพลีแซคคาไรด์ได้ (Kefali and Toker, 2006)

ตารางที่ 4.1 ผลของจุลินทรีย์โปรไบโอติก *L. salivarius* I203 ต่อน้ำหนักตัว น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และระดับเอนไซม์ไลโซไซม์ในซีรัมของไก่เนื้อที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์¹

Item	Control			LC-LSI203			DC-LSI203			SEM ²	P-value	Orthogonal contrasts ³			
	Control	NC	PC	1x10 ⁷	1x10 ⁸	1x10 ⁹	1x10 ⁷	1x10 ⁸	1x10 ⁹			1	2	3	4
Body weight (BW), g/chick															
7 Day	186.45 ^{ab}	175.61 ^b	187.47 ^{ab}	194.03 ^a	189.09 ^{ab}	184.27 ^{ab}	197.03 ^a	191.40 ^a	185.31 ^{ab}	1.214	0.001	0.290	0.000	0.461	0.430
14 Day	479.99 ^{ab}	448.19 ^b	482.64 ^{ab}	505.72 ^a	500.64 ^a	504.42 ^a	501.13 ^a	505.29 ^a	485.71 ^{ab}	3.399	<0.001	0.028	0.000	0.055	0.394
15 Day (after LPS injected)	511.94 ^{ab}	494.15 ^b	537.12 ^{ab}	539.38 ^{ab}	540.45 ^{ab}	519.91 ^{ab}	548.79 ^a	548.53 ^a	519.79 ^{ab}	4.011	0.007	0.041	0.001	0.933	0.520
Relative weight (g/g of BW)															
Liver	3.37 ^{ab}	3.70 ^{ab}	3.29 ^b	3.75 ^{ab}	3.68 ^{ab}	3.56 ^{ab}	3.85 ^a	3.91 ^a	3.69 ^{ab}	0.040	0.007	0.033	0.273	0.000	0.094
Spleen	0.23	0.22	0.24	0.21	0.22	0.20	0.22	0.20	0.20	0.005	0.634	0.243	0.552	0.103	0.968
Bursa	0.08 ^{ab}	0.10 ^a	0.10 ^{ab}	0.08 ^{ab}	0.10 ^{ab}	0.07 ^b	0.09 ^{ab}	0.09 ^{ab}	0.10 ^a	0.002	0.003	0.080	0.021	0.069	0.040
Lysozyme activity (ug/ml)															
	52.20 ^{ab}	30.17 ^c	45.33 ^b	41.95 ^{bc}	47.44 ^{ab}	52.39 ^a	50.68 ^{ab}	51.86 ^{ab}	57.77 ^a	1.616	<0.001	0.506	<0.001	0.079	0.006

^{a, b, c} Means with different letters in the same row are significantly different (P < 0.05).

¹ Treatments included: 1) control: PBS injection; 2) negative control (NC): LPS injection only; 3) positive control (PC): zinc bacitracin supplementation + LPS injection; 4-6) live cells (LC-LSI203) and 7-9) dead cells *L. salivarius* I203 (DC-LSI203), which were administered at levels of 1x10⁷ to 1x10⁹ CFU/bird/day, respectively, along with LPS injection.

² SEM = standard error of the means. NS = no significant difference.

³ Orthogonal contrasts: 1 = control vs. LC-LSI203 and DC-LSI203; 2 = NC VS LC-LSI203 and DC-LSI203; 3 = PC VS LC-LSI203 and DC-LSI203; 4 = Live cell LSI203 VS DC-LSI203

4.2 ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติก *L. salivarius* I203 ต่อลักษณะสัญญาณวิทยาของลำไส้ของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์

ผลของจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ต่อลักษณะสัญญาณวิทยาของลำไส้ไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ แสดงในตารางที่ 4.2 เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยกลุ่มทดลองด้วยวิธี Orthogonal contrasts พบว่าบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นของไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย มีความสูงของวิลไลและความลึกของคริปต์ สูงกว่ากลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มควบคุมบวก ($P < 0.05$) โดยเชื้อในรูปแบบเซลล์มีชีวิตมีผลในการเพิ่มความสูงวิลไลได้มากกว่าเซลล์ตาย ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าสัดส่วนวิลไลต่อความลึกคริปต์ในไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มควบคุมบวก ($P < 0.05$) โดยเชื้อในรูปแบบเซลล์ตายมีผลในการลดสัดส่วนดังกล่าวมากกว่ารูปแบบเซลล์เป็น ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยวิธี Tukey พบว่าไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์มีชีวิตที่ระดับ 1×10^8 CFU/ตัว/วัน มีความสูงวิลไลและความลึกคริปต์สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$)

ในส่วนลำไส้เล็กส่วนกลาง (ตารางที่ 4.2) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยกลุ่มทดลองด้วยวิธี Orthogonal contrasts พบว่า ไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย มีความสูงของวิลไล สูงกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) นอกจากนี้เชื้อในรูปแบบเซลล์มีชีวิตมีผลในการเพิ่มความลึกของคริปต์ได้มากกว่ารูปแบบเซลล์ตาย ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยวิธี Tukey พบว่าการป้อน *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์มีชีวิต ที่ระดับ 1×10^8 และ 1×10^9 CFU/ตัว/วัน และรูปแบบเซลล์ตาย ที่ระดับ 1×10^8 CFU/ตัว/วัน มีความสูงวิลไลที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$)

ในส่วนลำไส้เล็กส่วนท้าย (ตารางที่ 4.2) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยกลุ่มทดลองด้วยวิธี Orthogonal contrasts พบว่า ไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย มีความลึกของคริปต์มากกว่ากลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มควบคุมบวก ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยวิธี Tukey พบว่าการป้อนจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์ตาย ที่ระดับ 1×10^8 และ 1×10^9 CFU/ตัว/วัน และรูปแบบเซลล์มีชีวิต ที่ระดับ 1×10^7 CFU/ตัว/วัน มีความลึกของคริปต์มากกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$)

ลักษณะทางสัญญาณวิทยาของลำไส้สามารถบ่งชี้ถึงสุขภาพทางเดินอาหารของไก่เนื้อได้ โดยความสูงของวิลไลและความลึกของเซลล์คริปต์ในระดับที่เหมาะสมจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการดูดซึมอาหารที่ดี จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นไก่เนื้อให้เกิดการอักเสบด้วยไลโปโพลี

แซคคาไรด์ ส่งผลให้มีความสูงของวิลโลลดต่ำกว่าโกเนื้อที่อยู่ในสภาวะปกติ ซึ่งบ่งชี้ถึงการอักเสบที่เพิ่มขึ้นจากการแทรกซึมของเอนโดทอกซินเข้าสู่กระแสเลือดบริเวณลำไส้ และกระตุ้นการเกิดความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ในร่างกาย นำไปสู่การทำลายเนื้อเยื่อและเซลล์ต่าง ๆ บนผนังลำไส้ รวมถึงเซลล์กอบเลทที่ทำหน้าที่หลั่งเมือกบนผนังลำไส้ ส่งผลให้การพัฒนาในส่วนของวิลโลบริเวณลำไส้เล็กลดลง (El-Ghareeb et al., 2023) โดย Nie et al. (2018) รายงานว่าความเครียดทางภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการถูกกระตุ้นด้วยด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์จะทำลายโครงสร้างของเยื่อเมือกเซลล์ผนังลำไส้ เพิ่มการซึมผ่านของสารพิษ เพิ่มความลึกของเซลล์คริป และลดความสูงของวิลโลได้ Zhang et al. (2024) และ Xiong et al. (2018) รายงานว่าโกเนื้อที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์มีความสูงของวิลโลลดลงและพบว่าเซลล์เนื้อเยื่อบริเวณผนังลำไส้เล็กส่วนกลางและส่วนท้ายเกิดความเสียหายจากผลของการอักเสบ Ding et al. (2024) รายงานว่าการกระตุ้นโกเนื้อให้เกิดการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ส่งผลให้ความสูงของวิลโล และสัดส่วนความสูงของวิลโลต่อความลึกของคริปต์ลดลง อีกทั้งยังพบความลึกของคริปต์บริเวณลำไส้เล็กส่วนท้ายเพิ่มขึ้น

ขณะที่การบ่อนจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ในภาวะอักเสบจากการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ พบว่ามีผลในการเพิ่มความสูงของวิลโลที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนกลางได้เทียบเท่าโกเนื้อที่อยู่ในสภาวะปกติ ซึ่งอาจเกิดจากคุณสมบัติการยึดเกาะเยื่อผนังลำไส้และกลไกการยับยั้งเชื้อก่อโรค โดยจุลินทรีย์ *L. salivarius* ทำงานร่วมกับเยื่อผนังลำไส้และเยื่อเมือกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ตามรายงานของ Corr et al. (2007) ที่พบว่า *L. Salivarius* สามารถจับกับเมือกบนเยื่อผนังลำไส้โดยการใช้นำโปรตีนจับเมือก (mucus binding proteins) ได้แก่ LspA และ LspC และสามารถหลั่งโปรตีนแบคทีริโอซินที่ทำหน้าที่ทำลายเชื้อก่อโรค ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในชั้นเมือกและกระตุ้นให้เซลล์กอบเลทมีหลังเมือกเพิ่มขึ้น ซึ่งช่วยฟื้นฟูสภาพเยื่อผนังลำไส้หลังจากถูกทำลายได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Ding et al. (2024) ที่รายงานว่า การเสริม *L. reuteri* สามารถปรับปรุงลำไส้เล็กส่วนท้ายของโกเนื้อในสภาวะอักเสบจากการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ได้ โดยมีผลในการเพิ่มความสูงของวิลโล ลดความลึกของเซลล์คริปต์และเพิ่มสัดส่วนความสูงของวิลโลต่อความลึกของคริปต์ นอกจากนี้ Zhang et al. (2024) ยังรายงานว่า การเสริม *L. rhamnosus* GG ในโกเนื้อในสภาวะอักเสบสามารถเพิ่มความสูงของวิลโลและสัดส่วนความสูงของวิลโลต่อความลึกของคริปต์ได้เช่นกัน

อย่างไรก็ตาม การบ่อนจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ไม่สามารถปรับปรุงความลึกของคริปต์ในลำไส้เล็กของโกเนื้อในสภาวะอักเสบจากการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ได้ โดยพบว่ามีความลึกของคริปต์เพิ่มขึ้น ซึ่งบ่งชี้ถึงการปรับตัวและกลไกการซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดจากเอนโดทอกซินที่แทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อผ่านกลไกในระดับเซลล์ (Hu et al., 2011) ในสภาวะการอักเสบแบบเฉียบพลัน จุลินทรีย์โพรไบโอติกทางเดินอาหารสามารถ

กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดหรือภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงได้ โดยการกระตุ้นการทำงานของเซลล์มาโครฟาจ ซึ่งมีบทบาทในการจับกินสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย นอกจากนี้ Chang et al. (2014) รายงานว่า การรั่วไหลของสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ผนังลำไส้ มีผลให้เซลล์เด้นดริติกที่อยู่บริเวณลำไส้หลังโปรตีนเพื่อสื่อสารร่วมกับเซลล์บี (B-cell) และเหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่งแอนติบอดี เช่น IgA เพื่อจับเชื้อจุลินทรีย์หรือสิ่งแปลกปลอมในเยื่อบุผนังลำไส้ ซึ่งช่วยปรับสมดุลลำไส้และลดความเสียหายที่เกิดขึ้น สอดคล้องกับงานทดลองของ O'Callaghan et al. (2012) ที่รายงานว่าจุลินทรีย์ *L. salivarius* UCC118 สามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันจากเยื่อบุผนังลำไส้ โดยการเหนี่ยวนำการหลั่งโปรตีนทีโมไคน์และสารที่ลดการอักเสบ จากภายในเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ นอกจากนี้ การทดลองของ Alizadeh et al. (2024) รายงานว่าการเสริมโพรไบโอติกในรูปของสายพันธุ์ผสม (*L. crispatus* *L. oris* *L. reuteri* *L. johnsonii* และ *L. salivarius*) ในไก่เนื้อภาวะอักเสบจากการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ มีผลในการเพิ่มความถี่ของเซลล์คริปต์และลดสัดส่วนความสูงของวิลโลต่อความถี่ของคริปต์ของลำไส้เล็กส่วนกลางได้

จากผลการทดลองดังกล่าวนี้อาจบ่งชี้ถึงศักยภาพของจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ในการบรรเทาผลกระทบของสารพิษจากไลโปโพลีแซคคาไรด์ต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ไก่เนื้อในภาวะอักเสบ โดยการเพิ่มความสูงของวิลโล ซึ่งจะเพิ่มพื้นที่การดูดซึมสารอาหารของลำไส้ ส่งเสริมสมดุลสุขภาพลำไส้ และส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตและมีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ถึงแม้ว่าการบ่อนจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งสองรูปแบบจะสามารถปรับปรุงสุขภาพโดยรวมของเยื่อบุผนังลำไส้และการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ แต่ในส่วนของความถี่ของคริปต์และสัดส่วนความสูงของวิลโลต่อความถี่ของคริปต์ อาจไม่สามารถป้องกันการเพิ่มขึ้นในประเด็นนี้ได้ อันเนื่องมาจากสภาวะการอักเสบจากการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์แบบเฉียบพลัน

ตารางที่ 4.2 ผลของจุลินทรีย์โปรไบโอติก *L. salivarius* I203 ต่อลักษณะสัณฐานวิทยาของลำไส้ของไก่เนื้อที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์¹

Item	Control			LC-LSI203			DC-LSI203			SEM ²	P-value	Orthogonal contrasts ³			
	Control	NC	PC	1x10 ⁷	1x10 ⁸	1x10 ⁹	1x10 ⁷	1x10 ⁸	1x10 ⁹			1	2	3	4
Duodinum (µm)															
Villus height	706.73 ^c	734.10 ^{bc}	736.10 ^{bc}	862.39 ^{ab}	886.21 ^a	788.36 ^{abc}	777.15 ^{abc}	809.45 ^{abc}	720.24 ^c	12.68	<0.001	0.002	0.048	0.023	0.002
Crypt depth	59.22 ^d	66.55 ^d	76.66 ^{bcd}	75.30 ^{cd}	99.12 ^a	93.42 ^{abc}	92.82 ^{abc}	97.20 ^{ab}	103.50 ^a	11.825	<0.001	0.000	0.000	0.002	0.030
Villi/ Crypt	11.98 ^a	11.07 ^{ab}	11.01 ^{abc}	11.50 ^a	9.49 ^{abcd}	8.53 ^{bcd}	8.38 ^d	8.36 ^d	6.97 ^d	7.281	<0.001	0.000	0.001	0.002	0.000
Jejunum (µm)															
Villus height	398.30 ^a	261.16 ^b	346.78 ^{ab}	341.55 ^{ab}	420.31 ^a	420.40 ^a	361.79 ^{ab}	414.26 ^a	354.95 ^{ab}	2.849	<0.001	0.580	0.000	0.103	0.314
Crypt depth	83.17 ^{ab}	84.15 ^{ab}	80.95 ^{ab}	97.29 ^{ab}	102.73 ^a	101.92 ^a	87.11 ^{ab}	93.90 ^{ab}	72.74 ^b	2.501	0.014	0.137	0.177	0.073	0.002
Villi/ Crypt	4.789	3.532	4.284	4.083	4.017	4.125	4.153	4.412	4.656	2.062	0.329	0.084	0.135	0.177	0.455
Ilium (µm)															
Villus height	218.13	162.20	186.43	221.60	227.66	219.33	196.27	222.40	256.10	0.329	0.116	0.792	0.008	0.095	0.901
Crypt depth	41.67 ^{bc}	39.23 ^c	41.04 ^{bc}	62.65 ^{ab}	52.70 ^{abc}	52.88 ^{abc}	52.23 ^{abc}	63.73 ^a	63.83 ^a	0.161	0.001	0.003	0.001	0.002	0.308
Villi/ Crypt	4.89	3.66	4.35	3.65	4.66	4.88	3.97	3.80	3.98	0.134	0.102	0.076	0.214	0.638	0.117

a, b, c, d Means with different letters in the same row are significantly different (P < 0.05).

¹ Treatments included: 1) control: PBS injection; 2) negative control (NC): LPS injection only; 3) positive control (PC): zinc bacitracin supplementation + LPS injection; 4-6) live cells (LC-LSI203) and 7-9) dead cells *L. salivarius* I203 (DC-LSI203), which were administered at levels of 1x10⁷ to 1x10⁹ CFU/bird/day, respectively, along with LPS injection.

² SEM = standard error of the means. NS = no significant difference.

³ Orthogonal contrasts: 1 = control vs. LC-LSI203 and DC-LSI203; 2 = NC VS LC-LSI203 and DC-LSI203; 3 = PC VS LC-LSI203 and DC-LSI203; 4 = Live cell LSI203 VS DC-LSI203

4.3 ผลของจุลินทรีย์โพรไอติก *L. salivarius* I203 ต่อการผลิตกรดไขมันสายสั้น กรดแลคติก และการผลิตแอมโมเนียในซีรัมของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์

ผลของจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ต่อการผลิตกรดไขมันสายสั้น กรดแลคติก และการผลิตแอมโมเนียในซีรัมของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) แสดงในตารางที่ 4.3 เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยกลุ่มทดลองด้วยวิธี Orthogonal contrasts พบว่าไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย มีปริมาณกรดบิวทิริกสูงกว่ากลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มควบคุมบวก ($P < 0.05$) และมีปริมาณกรดวาเลอริกสูงกว่ากลุ่มควบคุมลบ โดยไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* I203 ในรูปแบบเซลล์ตายมีการผลิตกรดวาเลอริกสูงกว่าเซลล์มีชีวิต นอกจากนี้ ไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งสองรูปแบบยังมีปริมาณกรดไขมันสายสั้นสายโซ่กิ่ง (branched SCFA) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยวิธี Tukey พบว่า ไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์ตายที่ระดับ 1×10^9 และ 1×10^7 CFU/ตัว/วัน มีการผลิตกรดอะซิติกและบิวทิริกสูงสุดตามลำดับ ($P < 0.05$) และยังพบว่า ไก่กลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ในรูปแบบเซลล์ตายทุกระดับทำให้มีการผลิตกรดวาเลอริกสูงกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ ไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับ *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์มีชีวิต ในทุกระดับมีผลทำให้มีการผลิตกรดบิวทิริกสูงกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$)

สำหรับการผลิตกรดแลคติกในซีรัมของไก่เนื้อ (ตารางที่ 4.3) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยกลุ่มทดลองด้วยวิธี Orthogonal contrasts พบว่า ไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับการป้อนด้วยจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย มีปริมาณกรดแลคติกในซีรัมสูงกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยวิธี Tukey พบว่า ไก่กลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งสองรูปแบบที่ระดับสูงสุด (1×10^9 CFU/ตัว/วัน) สามารถเพิ่มปริมาณกรดแลคติกในซีรัมได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$)

สำหรับการผลิตแอมโมเนียในซีรัมของไก่เนื้อ (ตารางที่ 4.3) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยกลุ่มทดลองด้วยวิธี Orthogonal contrasts พบว่า ไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย มีปริมาณแอมโมเนียในซีรัมต่ำกว่ากลุ่มควบคุมลบและกลุ่มควบคุมบวก ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง พบว่าไก่กลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ในรูปแบบเซลล์มีชีวิตที่ระดับสูงสุด (1×10^9 CFU/ตัว/วัน) มีการผลิตแอมโมเนียในซีรัมต่ำกว่ากลุ่มควบคุมลบและกลุ่มควบคุมบวก ($P < 0.05$)

กรดไขมันสายสั้นและกรดแลคติกในซีกัมของไก่เป็นผลผลิตสุดท้ายที่เกิดจากกระบวนการหมักย่อยของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ส่วนท้าย ซึ่งสามารถสะท้อนถึงความสมบูรณ์ของสุขภาพลำไส้ รวมถึงระบบทางเดินอาหารของไก่ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าไก่เนื้อที่ได้รับจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ในภาวะอ็อกเสบจากการถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ส่งผลให้มีปริมาณของกรดไขมันสายสั้น (กรดอะซิติก กรดบิวทิริก และกรดวาเลอริก) และกรดแลคติกในซีกัมเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นปัจจัยบ่งชี้ถึงความสมดุลของประชากรจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร อาจเกิดจากคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหารของโพรไบโอติก ประกอบกับสุขภาพของผนังลำไส้ที่สมบูรณ์ จึงทำให้เกิดการยึดเกาะและตั้งรกราก (colonization) บนชั้นเยื่อเมือก ซึ่งสร้างสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อประชากรแบคทีเรียที่ไม่ใช่โปรตีโอลิติก (Non-proteolytic bacteria) เช่น *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงานหลัก และได้ผลผลิตคือกรดไขมันสายสั้นแบบสายตรง (straight-chain SCFA) ในซีกัมและบริเวณลำไส้ส่วนท้ายที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Meimandipour et al. (2010) ที่รายงานว่า การเสริม *L. salivarius* ssp. ในไก่เนื้อ ที่อายุ 14 วัน ส่งผลให้มีระดับความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกและกรดบิวทิริกในซีกัมเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Wang et al. (2021) รายงานว่า การเสริม *L. plantarum* ส่งผลให้มีระดับความเข้มข้นของกรดไขมันสายสั้นโดยรวมในซีกัมเพิ่มสูงขึ้นในไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นด้วย *C. perfringens* และงานทดลองของ Zhao et al. (2020) ที่รายงานว่า การเสริม *L. plantarum* ส่งผลให้มีระดับความเข้มข้นของกรดไขมันสายสั้นโดยรวมในซีกัมเพิ่มสูงขึ้นในไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยไมโคทอกซิน

นอกจากนี้ ในการทดลองครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการป้อนจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย มีผลในการลดความเข้มข้นของกรดไขมันสายสั้นสายโซ่กิ่ง เช่น ไอโซวาเลอริก และไอโซบิวทิริก ในไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ โดยกรดไขมันดังกล่าว (Branched SCFA) เกิดจากการหมักกรดอะมิโนสายโซ่กิ่ง (BCAAs) หรือ โปรตีน โดยแบคทีเรียโปรตีโอลิติก (proteolytic bacteria) เช่น *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp. และ *Proteus* spp. ซึ่งเป็นกลุ่มที่เจริญในสถานะที่ค่า pH ที่สูง (pH 6-7) โดยหากมีปริมาณของ Branched SCFA ที่สูง อาจเป็นสัญญาณของการหมักใช้โปรตีนเป็นแหล่งพลังงานมากกว่าปกติ ซึ่งความสอดคล้องกับการสะสมของสารพิษอย่าง แอมโมเนียและ ฟีนอลในซีกัม ซึ่งส่งผลเสียต่อสุขภาพไก่ บ่งชี้ถึงความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ (dysbiosis indicator) ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยทางความเครียด อาหารที่ไม่เหมาะสม หรือภาวะอ็อกเสบในลำไส้ (Shang et al., 2018) การลดลงของกรดไอโซ-วาเลอริก และไอโซ-บิวทิริก ในไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ เป็นผลมาจากกลไกการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหารของโพรไบโอติก และกระตุ้นการผลิตกรดไขมันสายสั้น ซึ่งเป็นการปรับสภาวะแวดล้อมของทางเดินอาหารให้มีความเป็นกรด ผ่านการลดค่า pH ในทางเดินอาหาร ส่งผลให้ลดจำนวนประชากรของแบคทีเรียโปรตีโอลิติก ซึ่งเป็นกลุ่มหลักในการผลิตกรดไขมันสายสั้นแบบแตกแขนง ในไก่เนื้อ สอดคล้องกับงานทดลองของ Liu et al. (2023) ที่รายงานว่า การเสริม *L. plantarum* มีผลใน

การเพิ่มความเข้มข้นของกรดบิวทิริกในชีกัม และยังมีผลในการลดความเข้มข้นของกรดไอโซ-วาเลอริก และไอโซ-บิวทิริกในไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นความเครียดด้วยแอมโมเนีย

นอกจากนี้ การทดลองครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการบ่อนจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ในภาวะอ็อกเสบจากการถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ส่งผลให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียในชีกัมลดต่ำลงได้เทียบเท่าไก่เนื้อที่อยู่ในสภาวะปกติ อันเนื่องมาจากบทบาทของกรดไขมันสายสั้นและกรดแลคติกในระดับที่เหมาะสมต่อการปรับสมดุลของลำไส้ ส่งผลให้ค่า pH ลดลง และเอื้อต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ขณะเดียวกันยังมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Clostridium spp.* และ *Proteus spp.* ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease-producing bacteria) และเกี่ยวข้องกับกรดสลายนกรดยูริกไปเป็นแอมโมเนีย (Liu et al., 2023) ส่งผลโดยตรงต่อการลดลงของปริมาณแอมโมเนียในชีกัม

จากผลดังกล่าว บ่งชี้ว่าจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย อาจมีศักยภาพในการบรรเทาผลกระทบจากสารพิษไลโปโพลีแซคคาไรด์ในไก่เนื้อได้ ผ่านการส่งเสริมการผลิตกรดไขมันสายสั้นและกรดแลคติกในทางเดินอาหาร อีกทั้งยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับการลดลงของความเข้มข้นแอมโมเนียในชีกัมด้วย

4.4 ผลของจุลินทรีย์ไบโอติก *L. salivarius* I203 ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของผนังลำไส้และการผลิตเยื่อเมือกในลำไส้เล็กส่วนกลางของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์

การศึกษาผลของจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของผนังลำไส้และการผลิตเยื่อเมือกในลำไส้เล็กส่วนกลางของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ แสดงผลในตารางที่ 4.4 เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยกลุ่มทดลองด้วยวิธี Orthogonal contrasts พบว่า ไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ในรูปแบบเซลล์มีชีวิต มีการแสดงออกของยีน *CLDN1* สูงกว่าในกลุ่มที่ได้รับเชื้อในรูปแบบเซลล์ตาย ($P < 0.05$) นอกจากนี้ การบ่อนจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีน *JAM2* สูงกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) โดยรูปแบบเซลล์ตายมีผลในการเพิ่มการแสดงออกของยีน *JAM2* ได้สูงกว่าเซลล์มีชีวิต ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยวิธี Tukey พบว่า การบ่อน *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์มีชีวิต ที่ระดับ 1×10^9 CFU/ตัว/วัน สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *OCLN* และ *CLDN1* เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ การบ่อน *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์มีชีวิตที่ระดับ 1×10^9 และเซลล์ตายที่ระดับ 1×10^8 – 1×10^9 CFU/ตัว/วัน ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีน *JAM2* สูงกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 4.3 ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติก *L. salivarius* I203 ต่อการผลิตกรดไขมันสายสั้น กรดแลกติก และการผลิตแอมโมเนียในซีกัมของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์¹

Item	Control			LC-LSI203			DC-LSI203			SEM ²	P-value	Orthogonal contrasts ³			
	Control	NC	PC	1x10 ⁷	1x10 ⁸	1x10 ⁹	1x10 ⁷	1x10 ⁸	1x10 ⁹			1	2	3	4
Short-hain fatty acid (% of total SCFA)															
Acetic acid	70.58 ^b	70.13 ^b	70.46 ^b	71.99 ^b	70.81 ^b	71.74 ^b	67.52 ^b	69.80 ^b	75.77 ^a	0.514	0.001	0.391	0.140	0.100	0.335
Propionic acid	7.15	7.36	8.69	7.65	6.99	6.24	7.53	7.24	6.33	0.254	0.614	0.661	0.853	0.177	0.140
Butyric acid	13.89 ^{cd}	12.50 ^e	13.35 ^{de}	13.61 ^{cd}	15.38 ^b	14.99 ^b	16.36 ^a	14.50 ^{bc}	13.22 ^{de}	0.241	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	0.053
Branched SCFA*	5.02 ^{ab}	5.53 ^a	4.86 ^{ab}	4.39 ^{ab}	4.06 ^b	4.44 ^{ab}	4.75 ^{ab}	4.46 ^{ab}	3.63 ^b	0.124	0.008	0.032	0.001	0.086	0.927
Valeric acid	3.36 ^{ab}	1.77 ^b	2.64 ^{ab}	2.36 ^{ab}	2.76 ^{ab}	2.58 ^{ab}	3.85 ^a	4.00 ^a	3.76 ^a	0.166	0.001	0.701	0.001	0.136	<0.001
Lactic acid (mmol/g of fresh cecal digesta)															
	0.094 ^{ab}	0.069 ^b	0.095 ^{ab}	0.073 ^b	0.088 ^{ab}	0.115 ^a	0.078 ^b	0.085 ^a	0.100 ^a	0.003	0.026	0.632	0.043	0.560	0.539
Ammonia concentration (mg/g of fresh cecal digesta)															
	0.430 ^{ab}	0.602 ^c	0.574 ^c	0.527 ^{bc}	0.516 ^{bc}	0.354 ^a	0.563 ^{bc}	0.557 ^{bc}	0.494 ^{bc}	0.014	<0.001	0.057	0.002	0.024	0.013

^{a, b, c, d, e} Means with different letters in the same row are significantly different (P < 0.05).

¹ Treatments included: 1) control: PBS injection; 2) negative control (NC): LPS injection only; 3) positive control (PC): zinc bacitracin supplementation + LPS injection; 4-6) live cells (LC-LSI203) and 7-9) dead cells *L. salivarius* I203 (DC-LSI203), which were administered at levels of 1x10⁷ to 1x10⁹ CFU/bird/day, respectively, along with LPS injection.

² SEM = standard error of the means. NS = no significant difference.

³ Orthogonal contrasts: 1 = control vs. LC-LSI203 and DC-LSI203; 2 = NC VS LC-LSI203 and DC-LSI203; 3 = PC VS LC-LSI203 and DC-LSI203; 4 = Live cell LSI203 VS DC-LSI203

สำหรับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเยื่อเมือก (*MUC2*) ในลำไส้เล็กส่วนกลาง (ตารางที่ 4.4) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยกลุ่มทดลองด้วยวิธี Orthogonal contrasts พบว่าไก่อเนื้อกลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย มีการแสดงออกของยีน *MUC2* สูงกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง เชื่อในรูปแบบเซลล์มีชีวิตมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนดังกล่าวได้มากกว่ารูปแบบเซลล์ตาย ($P < 0.05$) นอกจากนี้ การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยวิธี Tukey พบว่า การป้อนจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์มีชีวิตที่ระดับ (1×10^9 CFU/ตัว/วัน) มีผลเพิ่มการแสดงออกของยีน *MUC2* ได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมบวก ($P > 0.05$)

เยื่อบุผนังลำไส้ (intestinal epithelial barrier) มีบทบาทสำคัญต่อการรักษาภาวะสมดุลภายในลำไส้ โดยทำหน้าที่เป็นแนวป้องกันไม่ให้เชื้อโรค สารพิษ และแอนติเจนแทรกซึมเข้าสู่ชั้นเยื่อเมือก (Turner et al., 2009) โดยมีโปรตีนไทท์จังก์ชัน (tight junctions) เช่น zonula occludens-1 (ZO1), junctional adhesion molecule-2 (JAM2), Occludin (OCLN) และ Claudin (CLDN) ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างรอยต่อระหว่างผนังเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ (ช่วยควบคุมความสามารถในการซึมผ่านของสาร (intestinal permeability) และป้องกันการรั่วไหลของสารพิษ เชื้อก่อโรค สิ่งแปลกปลอมผ่านรอยต่อระหว่างเซลล์เข้าสู่ระบบไหลเวียนเลือด (Yao et al., 2022; Chelakkot et al., 2018) จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการป้อนจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์มีชีวิต ภายใต้สภาวะการอักเสบที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนไทท์จังก์ชัน ได้แก่ *OCLN*, *CLDN1* และ *JAM2* ในลำไส้เล็กส่วนกลาง ตลอดจนเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเยื่อเมือก ซึ่งชี้ถึงการเสริมสร้างความแข็งแรงของแนวกันผนังลำไส้ ชสอดคล้องกับงานทดลองของ Wei et al. (2023) ที่รายงานว่า การเสริม *L. salivarius* WZ1 มีผลในการเพิ่มการแสดงออกของยีน Occludin และ ZO-1 บนผนังลำไส้เล็กส่วนกลางของหนูที่ถูกกระตุ้นด้วย *E. coli*

ในขณะเดียวกันการป้อนจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์ตาย แม้ว่าจะไม่สามารถส่งเสริมการแสดงออกของยีนไทท์จังก์ชัน *CLDN1* ได้เทียบเท่ากับรูปแบบเซลล์มีชีวิต ($P < 0.05$) แต่สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *JAM2* ได้สูงกว่าเซลล์มีชีวิต ($P < 0.05$) ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากองค์ประกอบของผนังเซลล์ เช่น เพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ลิโปไทโคอิก (lipoteichoic acid; LTA) และเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharides, EPS) ที่สามารถจับกับตัวรับจำเพาะบนผนังลำไส้ ได้แก่ toll-like Receptors (*TLR2* และ *TLR4*) และส่งสัญญาณผ่านกลไกระดับเซลล์ที่เรียกว่า MyD88 Pathway (Karczewski et al., 2010) นอกจากนี้ จากงานวิจัยของ O'Callaghan et al. (2010) รายงานว่า *L. salivarius* สามารถปลดปล่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์และสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ เช่น เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ และโปรตีน S-layer (S-layer protein, Slp) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการแย่งจับกับเยื่อบุผนังลำไส้ ตลอดจนยับยั้งการสร้างไบโอฟิล์มของ

เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยกลไกดังกล่าวรวมถึงการจับแบบหลวมกับผนังลำไส้ของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและการขับออกจากลำไส้ กลไกนี้อาจช่วยลดความสามารถของเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะกับผนังลำไส้ในสถานะที่ลำไส้ของไก่เนื้อเกิดการอักเสบจากการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งส่งผลให้ผนังลำไส้สามารถฟื้นฟูโครงสร้างและหน้าที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการรายงานของ Liu et al. (2017) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เอ็กโซพอลิแซคคาไรด์สามารถลดการยึดเกาะและการสร้างไบโอฟิล์มของ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ในเซลล์จำลองเยื่อผนังลำไส้ หรือ CaCo-2 cell ได้

จากผลดังกล่าวบ่งชี้ว่าจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 มีศักยภาพในการส่งเสริมความแข็งแรงของโครงสร้างผนังลำไส้โดยรวมได้ โดยมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนไทท์จั้งชั้นและการผลิตเยื่อเมือกที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ ผลการทดลองยังพบว่าการป้อน *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย มีส่วนช่วยในการปรับปรุงลักษณะสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กส่วนกลางได้ (ตารางที่ 4.2) แต่อย่างไรก็ตาม การป้อนจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์ตายยังไม่สามารถลดผลกระทบโดยรวมของยีนไทท์จั้งชั้นและการผลิตเยื่อเมือกได้อย่างมีประสิทธิภาพเทียบเท่าเซลล์มีชีวิต

4.5 ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติก *L. salivarius* I203 ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นและยับยั้งการอักเสบในตับของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์

ผลของจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้น ($TNF-\alpha$ และ $IL-1\beta$) และยับยั้งการอักเสบ ($IL-4$) ในตับของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยกลุ่มทดลองด้วยวิธี Orthogonal contrasts พบว่า ไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย มีการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ $TNF-\alpha$ ในตับลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มควบคุมบวก ($P < 0.05$) เช่นเดียวกันกับการแสดงออกของยีน $IL-1\beta$ ที่ลดลงในกลุ่มที่ได้รับการป้อน *L. salivarius* I203 ทั้งสองรูปแบบเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มควบคุมบวก ($P < 0.05$) และไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยวิธี Tukey พบว่าการป้อนจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและรูปแบบเซลล์ตายที่ทุกระดับความเข้มข้น (1×10^7 – 1×10^9 CFU/ตัว/วัน) มีการแสดงออกของยีน $TNF-\alpha$ ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ การป้อนจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์มีชีวิตที่ระดับสูงสุด (1×10^9 CFU/ตัว/วัน) และเซลล์ตายที่ระดับ 1×10^8 CFU/ตัว/วัน ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีน $IL-1\beta$ ลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมลบ ($P < 0.05$) โดยเทียบเท่ากับกลุ่มควบคุม และกลุ่มควบคุมบวก ($P > 0.05$)

ตารางที่ 4.4 ผลของจุลินทรีย์โปรไบโอติก *L. salivarius* I203 ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของผนังลำไส้และเยื่อเมือก ในลำไส้ลำไส้เล็กส่วนกลางของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์¹

Item	Control			LC-LSI203			DC-LSI203			SEM ²	P-value	Orthogonal contrasts ³			
	Control	NC	PC	1×10 ⁷	1×10 ⁸	1×10 ⁹	1×10 ⁷	1×10 ⁸	1×10 ⁹			1	2	3	4
Tight junction protein⁴															
<i>OCLN</i>	1.00 ^{ab}	0.94 ^b	1.72 ^{ab}	0.74 ^b	1.67 ^{ab}	2.45 ^a	0.77 ^b	1.39 ^{ab}	1.45 ^{ab}	0.201	<0.001	0.213	0.154	0.346	0.100
<i>CLDN1</i>	1.00 ^b	1.05 ^b	1.17 ^b	0.55 ^b	0.89 ^{bc}	2.08 ^a	0.79 ^b	1.01 ^{ab}	1.20 ^b	0.083	0.005	0.128	0.203	0.487	0.023
<i>JAM2</i>	1.00 ^b	0.99 ^b	1.76 ^{ab}	1.60 ^{ab}	1.75 ^{ab}	1.76 ^a	1.75 ^{ab}	2.20 ^a	2.17 ^a	0.093	<0.001	0.000	0.000	0.932	0.001
Mucin															
<i>MUC2</i>	1.00 ^{abc}	0.88 ^c	1.95 ^{ab}	1.50 ^{abc}	1.39 ^{abc}	2.34 ^a	1.05 ^{bc}	1.27 ^{abc}	1.56 ^{abc}	0.119	0.003	0.060	0.022	0.059	0.033

^{a, b, c} Means with different letters in the same row are significantly different (P < 0.05).

¹ Treatments included: 1) control: PBS injection; 2) negative control (NC): LPS injection only; 3) positive control (PC): zinc bacitracin supplementation + LPS injection; 4-6) live cells (LC-LSI203) and 7-9) dead cells *L. salivarius* I203 (DC-LSI203), which were administered at levels of 1×10⁷ to 1×10⁹ CFU/bird/day, respectively, along with LPS injection.

² SEM = standard error of the means. NS = no significant difference.

³ Orthogonal contrasts: 1 = control vs. LC-LSI203 and DC-LSI203; 2 = NC VS LC-LSI203 and DC-LSI203; 3 = PC VS LC-LSI203 and DC-LSI203; 4 = Live cell LSI203 VS DC-LSI203

⁴ Tight junction protein : *OCLN* = ccludin, *CLDN1* = Cludin1, *JAM2* = junctional adhesion molecule2

สำหรับการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-4 (IL-4) (ตารางที่ 4.5) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยกลุ่มทดลองด้วยวิธี Orthogonal contrasts พบว่า ไก่เนื้อกลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย มีการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-4 สูงกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มควบคุมบวก ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองโดยวิธี Tukey พบว่าการป้อน *L. salivarius* I203 รูปแบบเซลล์ตายที่ระดับ 1×10^7 CFU/ตัว/วัน สามารถเพิ่มการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-4 ได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มควบคุมบวก ($P < 0.05$) แต่อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-4 ในตับของไก่ที่ได้รับเชื้อทั้งสองรูปแบบไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$)

โปรตีนไซโตไคน์เป็นโปรตีนสื่อสัญญาณขนาดเล็กที่สร้างขึ้นโดยเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน มีบทบาทในการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์เพื่อควบคุมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและกระบวนการอักเสบในร่างกาย จากผลการทดลองพบว่า การกระตุ้นไก่เนื้อให้เกิดภาวะการอักเสบด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ส่งผลให้การแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-4 ที่เกี่ยวข้องกับไซโตไคน์ก่อการอักเสบ ได้แก่ TNF- α และ IL-1 β ในตับเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้ถึงระดับของการอักเสบที่เพิ่มขึ้นของตับ ภาวะดังกล่าวมีสาเหตุจากการที่สารพิษไลโปโพลีแซคคาไรด์ซึมผ่านลำไส้เข้าสู่กระแสเลือดและเคลื่อนเข้าสู่ตับ (He et al., 2021) ส่งผลให้เซลล์ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด เช่น มาโครฟาจ หรือเซลล์คูปเฟอร์ ในตับ ถูกกระตุ้นให้ตอบสนองต่อองค์ประกอบของจุลินทรีย์ก่อโรค ในรูปแบบของ microbe-associated molecular patterns (MAMP) ซึ่งสามารถตรวจจับได้ผ่านตัวรับ TLR4 บนผิวเซลล์ตับ เมื่อมีการจับกับไลโปโพลีแซคคาไรด์ผ่าน MyD88 pathway นำไปสู่การกระตุ้นการทำงานของสองเส้นทางหลัก คือ nuclear factor-kappa B (NF- κ B) pathway และ Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) ทำให้เกิดการผลิตและหลั่ง ไซโตไคน์ที่มีฤทธิ์ก่อการอักเสบเพิ่มขึ้น (Akash et al., 2018) นอกจากนี้ He et al. (2021) รายงานว่า การกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ยังส่งผลให้การแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-4 และ IL-10 เพิ่มขึ้น พร้อมทั้งยับยั้งอินเตอร์ลิวคิน-4 และ IL-10 เป็นผลมาจากการทำงานของเซลล์คูปเฟอร์ที่ผลิต NADPH Oxidase มากกว่าปกติ นำไปสู่การสร้างอนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) ในระดับสูง กระตุ้นการทำงานของ NF- κ B และส่งผลให้การหลั่ง TNF- α เพิ่มขึ้น รวมถึงมีการกระตุ้น Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทยับยั้งการหลั่งโปรตีนไซโตไคน์ด้านการอักเสบ (IL-4 และ IL-10) ทำให้ตับไม่สามารถควบคุมหรือฟื้นฟูกระบวนการอักเสบได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ขณะที่ไก่กลุ่มที่ได้รับจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ภายใต้ภาวะอักเสบจากการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ สามารถลดการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-4 และ IL-1 β และเพิ่มการแสดงออกของอินเตอร์ลิวคิน-4 ของตับได้ เป็นผลมาจากคุณสมบัติเฉพาะของโพรไบโอติกที่มีชีวิตในการปรับความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ และเพิ่มการผลิตสารต้านจุลชีพ (กรด

ไขมันสายสั้น) เกิดเป็นกลไกการกีดกันแก่งแย่งกับเชื้อก่อโรค และปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกัน ผ่านการยึดจับกับตัวรับ TLR2 บนเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ ซึ่งจะเริ่มกระบวนการตอบสนองต่อการอักเสบผ่านการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด เช่น มาโครฟาจ เซลล์เดนดริติก และเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ ส่งผลให้เกิดการหลั่งโปรตีนไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการลดการอักเสบ (anti-inflammatory cytokine) เช่น IL-4, IL-10 ซึ่งช่วยกระตุ้นการทำงานของเฮเทอโรฟิล มาโครฟาจ และ T cell เพิ่มเสริมการตอบสนองภูมิคุ้มกัน รวมถึงส่งเสริมการฟื้นฟูของเนื้อเยื่อภายในร่างกาย (Smith et al., 2016) นอกจากนี้สำหรับโพลีโบไอติก หรือโพรไบโอติกเซลล์ตาย ซึ่งแม้ว่าจะไม่สามารถเปลี่ยนแปลงสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ได้โดยตรง แต่ส่วนประกอบของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตทางชีวภาพ เช่น เพปทิโดไกลแคน (peptidoglycans) เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ (exopolysaccharide; EPS) ลิโปเทอิก (Lipoteichoic Acid; LTA) กรดไขมันสายสั้น (Short-chain fatty acid; SCFAs) และโปรตีน S-layer (S-layer proteins; Slp) ยังคงสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทั้งในทางตรงและทางอ้อมได้ โดยเฉพาะลิโปเทอิกและ S-layer proteins ที่สามารถจับกับตัวรับ TLR2 บนเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้หรือเซลล์ภูมิคุ้มกันในตับ เช่น เซลล์เดนดริติก (dendritic cells) และ มาโครฟาจ ส่งผลให้เกิดการสร้างไซโตไคน์ต้านการอักเสบ เช่น IL-10 IL-4 และ TGF- β ในขณะที่ลดการหลั่งไซโตไคน์ที่กระตุ้นการอักเสบ เช่น TNF- α และ IL-1 β ในตับได้ (Wang et al., 2018) นอกจากนี้ เอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์ยังสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ Regulatory T cells (Treg cells) ที่อยู่ในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองที่เกี่ยวข้องกับลำไส้ (Gut associated lymphoid tissue; GALT) เช่น CD4+ และ CD8+ ซึ่งทำหน้าที่รักษาสมดุลของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ลดความรุนแรงของการอักเสบ และสนับสนุนการฟื้นฟูของเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย ส่งผลให้ Treg cells สามารถสร้างโปรตีนไซโตไคน์ที่ลดการอักเสบได้เพิ่มขึ้นนำไปสู่การยับยั้งกลไกระดับเซลล์เรียกว่า NF- κ B pathway รวมถึงยับยั้งกระบวนการ MAPK signaling pathway ในตับได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Aguilar-Toalá et al. (2018) ที่รายงานว่า การเสริมโพลีโบไอติกที่ประกอบด้วยส่วนผนังเซลล์ของ *Lactobacillus* สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ TLR2 และเพิ่มการสร้าง IL-10 พร้อมยับยั้ง NF- κ B ในเซลล์จำลองเยื่อบุผนังลำไส้ หรือ CaCo-2 cell ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการลดการอักเสบในระบบทางเดินอาหารและตับ นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นและยับยั้งการอักเสบในตับที่เพิ่มขึ้นนี้มีความสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสัมพัทธ์ของตับของไก่เนื้อในสภาวะการอักเสบได้เช่นกัน จึงสามารถบ่งชี้ได้ว่าการป้อนจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและรูปแบบเซลล์ตายสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในการยับยั้งการอักเสบแบบฉับพลันจากการถูกกระตุ้นโดยไลโปโพลีแซ็กคาไรด์ได้

ตารางที่ 4.5 ผลของจุลินทรีย์โพรไบโอติก *L. salivarius* I203 ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นและยับยั้งการอักเสบในตับของไก่เนื้อที่ถูกกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์¹

Item	Control			LC-LSI203			DC-LSI203			SEM ²	P-value	Orthogonal contrasts ³			
	Control	NC	PC	1x10 ⁷	1x10 ⁸	1x10 ⁹	1x10 ⁷	1x10 ⁸	1x10 ⁹			1	2	3	4
Pro-inflammatory															
TNF- α	1.00 ^a	2.45 ^b	1.12 ^{ab}	0.31 ^a	0.19 ^a	0.18 ^a	0.48 ^a	0.14 ^a	0.06 ^a	0.077	<0.01	0.038	0.000	0.019	0.980
IL-1 β	1.00 ^{abc}	1.55 ^c	1.26 ^{ab}	1.07 ^{abc}	0.91 ^{ab}	0.60 ^a	0.95 ^{abc}	0.45 ^a	0.67 ^{ab}	0.065	<0.01	0.164	0.000	0.003	0.128
Anti-inflammatory															
IL-4	1.00 ^d	2.44 ^{bcd}	2.29 ^{bcd}	1.70 ^{cd}	3.03 ^{abcd}	4.58 ^a	3.91 ^{ab}	3.23 ^{abc}	2.21 ^{bcd}	0.279	<0.01	0.001	0.072	0.048	0.778

a, b, c Means with different letters in the same row are significantly different (P < 0.05).

¹Treatments included: 1) control: PBS injection; 2) negative control (NC): LPS injection only; 3) positive control (PC): zinc bacitracin supplementation + LPS injection; 4-6) live cells (LC-LSI203) and 7-9) dead cells *L. salivarius* I203 (DC-LSI203), which were administered at levels of 1x10⁷ to 1x10⁹ CFU/bird/day, respectively, along with LPS injection.

²SEM = standard error of the means. NS = no significant difference.

³Orthogonal contrasts: 1 = control vs. LC-LSI203 and DC-LSI203; 2 = NC vs LC-LSI203 and DC-LSI203; 3 = PC vs LC-LSI203 and DC-LSI203; 4 = Live cell LSI203 vs DC-LSI203

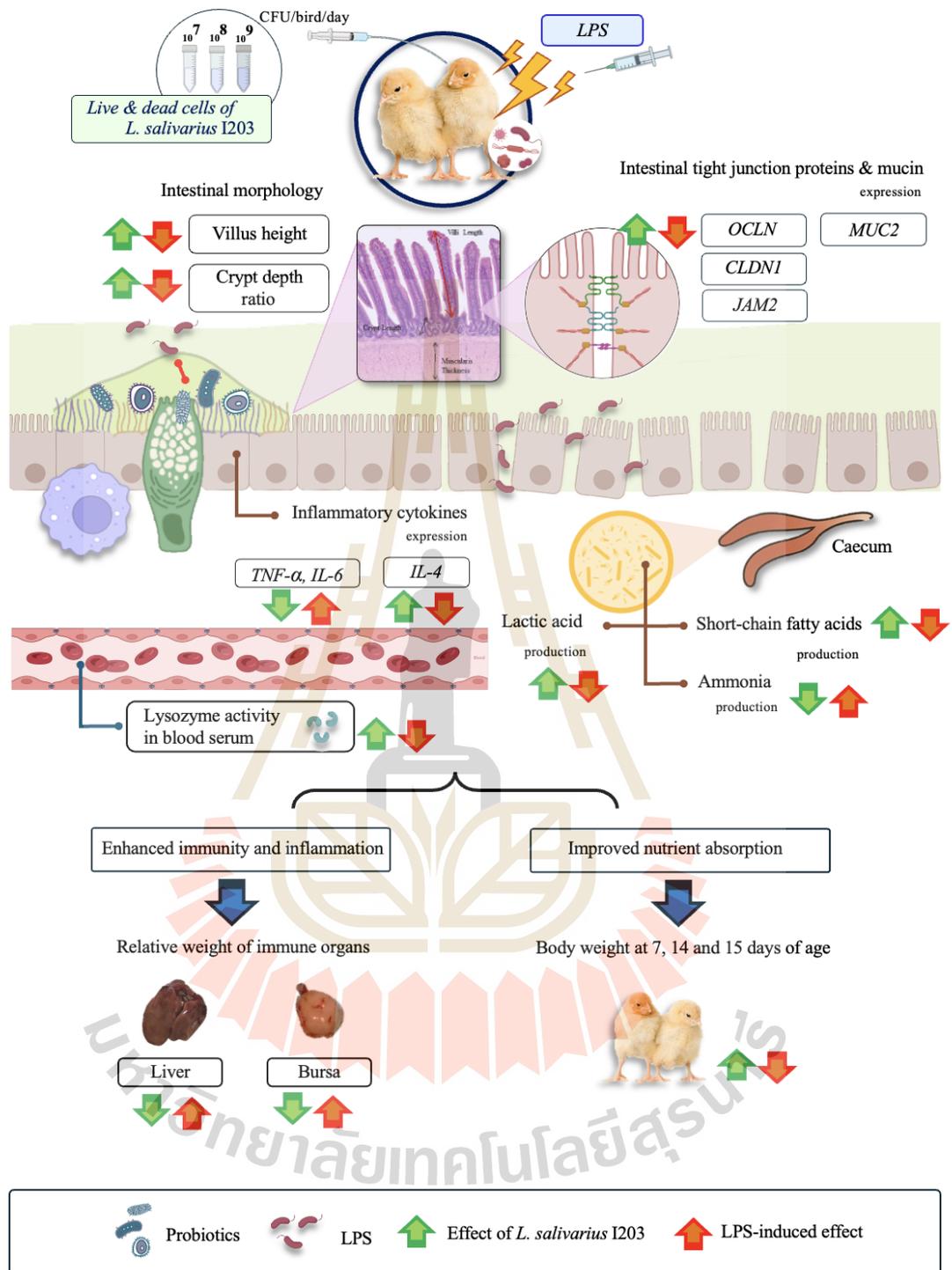
4.6 ผลของการใช้เทคนิค Fourier Transform Infrared (FTIR) Microspectroscopy เพื่อศึกษาโครงสร้างของผนังเซลล์ *L. salivarius* I203

โครงสร้างของผนังเซลล์มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานกับร่วมกับโฮสต์โดยเฉพาะในด้านการยึดเกาะกับเยื่อบุลำไส้ การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และการส่งสัญญาณระหว่างจุลินทรีย์กับเซลล์ของโฮสต์ การวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของ S-layer protein บนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติก *L. salivarius* I203 ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ด้วยเทคนิค FTIR microspectroscopy พบความแตกต่างทางโครงสร้าง ระหว่างสองกลุ่ม ($P < 0.05$) โดยจุลินทรีย์รูปแบบเซลล์ตายที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของ s-layer protein โดยมีการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนโครงสร้าง β -sheet (จาก 37.4% ในเซลล์มีชีวิต เป็น 63.5% ในเซลล์ตาย) ร่วมกับการลดลงของโครงสร้าง α -helix ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสะท้อนถึงการจัดเรียงตัวใหม่ของ S-layer protein ที่อาจส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะประสิทธิภาพในการปรับปรุงสุขภาพลำไส้ของไก่เนื้อที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งในการศึกษานี้ พบว่า *L. salivarius* I203 ในรูปแบบเซลล์ตายสามารถลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของตับ (เช่น *IL-1 β* และ *TNF- α*) และเพิ่มการแสดงออกของยีน *IL-4* ซึ่งเป็นไซโตไคน์ต้านการอักเสบ นอกจากนี้ยังมีผลเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของผนังลำไส้ (เช่น *JAM2*) ได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 4.6 โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของ S-layer protein บนผนังเซลล์ของจุลินทรีย์โพรไบโอติก *L. salivarius* I203

Item	Amide I Maximum position (cm ⁻¹)	S-layer secondary structure (%)		
		β -Sheet	α -Helix	Other ¹
Live cell <i>L. salivarius</i> I203	1654	37.4	19.4	43.2
Dead cell <i>L. salivarius</i> I203	1656	63.5	6.8	29.7

¹Other = β turn and non-ordered structures (side chain vibrations)



ภาพที่ 4.1 แสดงภาพรวมผลกระทบของ LPS และผลของการป้อนจุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 บทสรุป

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินประสิทธิภาพของโพรไบโอติก *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ในการบรรเทาภาวะการอักเสบที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ ในไก่เนื้อ โดยศึกษาการแสดงออกของไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ การผลิตกรดไขมันสายสั้นและกรดแลคติก รวมถึงการผลิตแอมโมเนียในซีกัม ผลการศึกษาสรุปได้ดังนี้

5.1.1 จุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย สามารถเพิ่มน้ำหนักตัวของไก่เนื้อในช่วงอายุ 7 14 และ 15 วัน รวมถึงลดน้ำหนักสัมพัทธ์ของเบอร์ซา และเพิ่มระดับเอนไซม์ไลโซไซม์ในซีรัม ซึ่งบ่งชี้การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการใช้จุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งสองรูปแบบ ที่ลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของตับ ได้แก่ *TNF- α* และ *IL-1 β* แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของ *L. salivarius* I203 ในการควบคุมสมดุลการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันและลดความรุนแรงของการอักเสบในไก่เนื้อที่ได้รับการกระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์

5.1.2 จุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย มีผลปรับปรุงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำไส้ในไก่เนื้อที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของผนังลำไส้ ได้แก่ *OCLN*, *CLDN1* และ *JAM2* และการผลิตเยื่อเมือก (*MUC2*) โดยรูปแบบเซลล์มีชีวิตสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *OCLN* และ *MUC2* ขณะที่ทั้งรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายสามารถเพิ่มการแสดงออกของ *JAM2*

5.1.3 จุลินทรีย์ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ส่งผลให้ระดับกรดไขมันสายสั้น ได้แก่ กรดบิวทิริก กรดไขมันสายสั้นสายโซ่กิ่ง และกรดวาเลอริก รวมถึงกรดแลคติกเพิ่มสูงขึ้น และลดระดับแอมโมเนียในซีกัมของไก่เนื้อที่กระตุ้นด้วยไลโปโพลีแซคคาไรด์ได้ ซึ่งบ่งชี้ถึงการปรับปรุงสภาพแวดล้อมในซีกัมและการส่งเสริมสุขภาพของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการขยายระยะเวลาการศึกษาครอบคลุมตลอดช่วงอายุการเลี้ยงของไก่เนื้อ เพื่อให้สามารถประเมินผล ของ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย ต่อระบบ

ภูมิคุ้มกัน สุขภาพลำไส้ ประสิทธิภาพการเจริญเติบโต และคุณภาพซากของไก่เนื้อได้อย่างครอบคลุม โดยเฉพาะภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่ใกล้เคียงกับฟาร์มเชิงพาณิชย์ เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน

5.2.2 ควรมีการศึกษากลไกระดับโมเลกุลเพิ่มเติม เพื่อทำความเข้าใจบทบาทเชิงหน้าที่ของ *L. salivarius* I203 ทั้งในรูปแบบเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตาย โดยเฉพาะในด้านการกระตุ้นหรือยับยั้ง การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน การคงสภาพของเยื่อผนังลำไส้ และการตอบสนองต่อการอักเสบ ทั้งนี้เพื่อสร้างองค์ความรู้พื้นฐานเชิงลึกสำหรับการพัฒนาเสริมสุขภาพสัตว์ในอนาคต

5.2.3 ควรมีการศึกษาถึงผลของ *L. salivarius* I203 ทั้งสองรูปแบบต่อองค์ประกอบและความหลากหลายของจุลินทรีย์ในลำไส้ (gut microbiota) เพื่อทำความเข้าใจกลไกที่สัมพันธ์กับสุขภาพลำไส้ การดูดซึมสารอาหาร และภูมิคุ้มกันของสัตว์อย่างครอบคลุมและแม่นยำ



เอกสารอ้างอิง

- Abeddargahi, F., Kuhi, H. D., Moghaddam, S. H. H., Mehr, M. R. A., Hosseini, A., Sajedi, R. H. & Shini, S. (2021). Effect of probiotic supplementation on performance, morphology and gene expression associated with immune responses in early age of broiler chickens exposed to stress induced by corticosterone injection. **Animal Production Science**, 62, 450-461.
- Aleksandrak-Piekarczyk, T., Puzia, W., Żylińska, J., Cieśła, J., Gulewicz, K. A., Bardowski, J. K., & Górecki, R. K. (2019). Potential of *Lactobacillus plantarum* IBB 3036 and *Lactobacillus salivarius* IBB 3154 to persistence in chicken after in ovo delivery. **Microbiology Open**, 8(1), 00620.
- Alhotan, R. A., Al Sulaiman, A. R., Alharthi, A. S., & Abudabos, A. M. (2021). Protective influence of betaine on intestinal health by regulating inflammation and improving barrier function in broilers under heat stress. **Poultry Science**, 100(9), 101337.
- Alizadeh, M., Shojadoost, B., Fletcher, C., Wang, A., Abdelaziz, K., & Sharif, S. (2024). Treatment of chickens with lactobacilli prior to challenge with *Clostridium perfringens* modifies innate responses and gut morphology. **Research in Veterinary Science**, 172, 105241.
- Arribas, B., Garrido-Mesa, N., Perán, L., Camuesco, D., Comalada, M., Bailón, E., & Gálvez, J. (2012). The immunomodulatory properties of viable *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius* CECT5713 are not restricted to the large intestine. **European Journal of Nutrition**, 51(3), 365-374.
- Brisbin, J. T., Gong, J., Parvizi, P., & Sharif, S. (2010). Effects of lactobacilli on cytokine expression by chicken spleen and cecal tonsil cells. **Clinical and Vaccine Immunology**, 17(9), 1337-1343.
- Chang, S. Y., Ko, H. J., & Kweon, M. N. (2014). Mucosal dendritic cells shape mucosal immunity. **Experimental & Molecular Medicine**, 46(3), 84-84.

- Chen, L., Ma, S., Cao, A., & Zhao, R. (2024). Bile acids promote lipopolysaccharide clearance via the hepato-biliary pathway in broiler chickens. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 282, 116767.
- Chen, X., Ishfaq, M., & Wang, J. (2022). Effects of *Lactobacillus salivarius* supplementation on the growth performance, liver function, meat quality, immune responses, and Salmonella Pullorum infection resistance of broilers challenged with Aflatoxin B1. **Poultry Science**, 101(3), 101651.
- Chuang, L., Wu, K. G., Pai, C., Hsieh, P. S., Tsai, J. J., Yen, J. H., & Lin, M. Y. (2007). Heat-killed cells of lactobacilli skew the immune response toward T helper 1 polarization in mouse splenocytes and dendritic cell-treated T cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55(26), 11080-11086.
- Corr, S. C., Li, Y., Riedel, C. U., O'Toole, P. W., Hill, C., & Gahan, C. G. (2007). Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 104(18), 7617-7621.
- Deepthi, B.V., Rakesh, S., Poornachandra, K., Deepa, N., Dharanesha, N. K., Girish, K. S., Sreenivasa, M. Y. (2017). *Lactobacillus plantarum* MYS6 ameliorates fumonisin B1-induced hepatorenal damage in broilers. **Frontiers in Microbiology**, 8, 2317
- Ding, X., Tang, R., Zhao, J., Xu, Y., Fu, A. & Zhan, X. (2024). *Lactobacillus reuteri* alleviates LPS-induced intestinal mucosal damage by stimulating the expansion of intestinal stem cells via activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in broilers. **Poultry Science**, 103(10), 104072.
- Ehrmann, M. A., Kurzak, P., Bauer, J., & Vogel, R. F. (2002). Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. **Journal of Applied Microbiology**, 92(5), 966-975.
- El-Ghareeb, W. R., Kishawy, A. T., Anter, R. G., Aboelabbas Gouda, A., Abdelaziz, W. S., Alhawas, B., & Ibrahim, D. (2023). Novel antioxidant insights of myricetin on the performance of broiler chickens and alleviating experimental infection with *Eimeria* spp.: crosstalk between oxidative stress and inflammation. **Antioxidants**, 12(5), 1026.

- Ferro, M., Charneca, S., Dourado, E., Guerreiro, C. S., & Fonseca, J. E. (2021). Probiotic supplementation for *Rheumatoid arthritis*: A promising adjuvant therapy in the gut microbiome Era. **Frontiers in Pharmacology**, 12.
- Froebel, L. E., Calik, A., Emami, N. K., Blue, C. E., & Dalloul, R. A. (2024). Evaluating performance, intestinal lesions, and immunity related genes in heritage and modern broiler breeds during a necrotic enteritis challenge. **Poultry Science**, 103(12), 104339.
- Jahromi, M. F., Altaher, Y. W., Shokryazdan, P., Ebrahimi, R., Ebrahimi, M., Idrus, Z., & Liang, J. B. (2016). Dietary supplementation of a mixture of *Lactobacillus* strains enhances performance of broiler chickens raised under heat stress conditions. **International Journal of Biometeorology**, 60(7), 1099-1110.
- Kreukniet, M. B., M. G. B. Nieuwland, & A. J. Van der Zijpp. (1995). Phagocytic activity of two lines of chickens divergently selected for antibody production. *Vet. Immunol. Immunopathology*, 44, 377–387.
- Li, Y., H. Zhang, Y. P. Chen, M. X. Yang, L. L. Zhang, Z. X. Lu, & T. Wang. 2015. *Bacillus amyloliquefaciens* supplementation alleviates immunological stress in lipopolysaccharide-challenged broilers at early age. **Poultry Science**, 94, 1504-1511.
- Liu, H., Xu, K., Wang, H., Lin, H., Yang, X., Wang, X., & Lu, Y. (2024). Effects of different forms of amino acid supplementation on the performance and intestinal barrier function of laying hens fed a low-protein diet. **Poultry Science**, 103(12), 104375.
- Liu, W.-C., Pan, Z.-Y., Zhao, Y., Guo, Y., Qiu, S.-J., Balasubramanian, B., & Jha, R. (2022). Effects of heat stress on production performance, redox status, intestinal morphology and barrier-related gene expression, cecal microbiome, and metabolome in indigenous broiler chickens. **Frontiers in Physiology**, 13, 890520.
- Liu, X., Cao, G., Qiu, K., Dong, Y., & Hu, C. (2023). *Lactobacillus plantarum* decreased ammonia emissions through modulating cecal microbiota in broilers challenged with ammonia. **Animals**, 13(17), 2739.
- Mehrnaz, N., Fatemeh, R., Davoud, A., Farhad, M., Elham, S., Shahram, L., & and Vahid Khoddami, V. (2010). Inhibitory effects of *Lactobacillus salivarius* and

- Lactobacillus crispatus* isolated from chicken gastrointestinal tract on *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* growth. **Iranian Journal of Biotechnology**, 2010; 8 (1): 32-37
- Meimandipour, A., Hair-Bejo, M., Shuhaimi, M., Azhar, K., Soleimani, A. F., Rasti, B., & Yazid, A. M. (2010). Gastrointestinal tract morphological alteration by unpleasant physical treatment and modulating role of *Lactobacillus* in broilers. **British Poultry Science**, 51(1), 52-59.
- Mercan, E., İspirli, H., Sert, D., Yılmaz, M. T., & Dertli, E. (2015). Impact of exopolysaccharide production on functional properties of some *Lactobacillus salivarius* strains. **Archives of Microbiology**, 197, 1041-1049.
- Neville, B. A., & O'Toole, P. W. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* and closely related *Lactobacillus* species. **Future Microbiology**, 5(5), 759-774.
- Nie, W., Wang, B., Gao, J., Guo, Y., & Wang, Z. (2018). Effects of dietary phosphorous supplementation on laying performance, egg quality, bone health and immune responses of laying hens challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Journal of Animal Science and biotechnology**, 9, 1-11.
- Niu, X., Ding, Y., Chen, S., Gooneratne, R., & Ju, X. (2022). Effect of immune stress on growth performance and immune functions of livestock: mechanisms and prevention. **Animals**, 12(7), 909.
- NRC. 1994. Nutrient requirements of poultry. (9th ed.). Washington, DC., USA: **National Academy Press**.
- O'Callaghan, J., Buttó, L. F., MacSharry, J., Nally, K., & O'Toole, P. W. (2012). Influence of adhesion and bacteriocin production by *Lactobacillus salivarius* on the intestinal epithelial cell transcriptional response. **Applied and Environmental Microbiology**, 78(15), 5196-5203.
- Orso, C., Cony, B., Silva, J., Furtado, J. C. V., Mann, M. B., Frazzon, J., & Ribeiro, A. M. L. (2022). Effect of live *Eimeria* vaccination or salinomycin on growth and immune status in broiler chickens receiving in-feed inclusion of gelatin and vitamin E. **Poultry Science**, 101(12), 102206.

- Philippe, F. X., J. F. Cabaraux, & B. Nicks. 2011. Ammonia emissions from pig houses: Influencing factors and mitigation techniques. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, 141,245-260.
- Ratcliffe, M. J., & S. Härtle. 2022. Avian immunology. Third Edition. B cells, the bursa of fabricius, and the generation of antibody repertoires. **Academic Press**, pp. 71-99.
- Rondón, A., Rodríguez, M., Milian, G., & Beruvides, A. (2020). Probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* in animals of zootechnical interest. **Cuban Journal of Agricultural Science**, 54(2).
- Saint-Cyr, M. J., Haddad, N., Taminiau, B., Poezevara, T., Quesne, S., Amelot, M., & Guyard-Nicodème, M. (2017). Use of the potential probiotic strain *Lactobacillus salivarius* SMXD51 to control *Campylobacter jejuni* in broilers. **International Journal of Food Microbiology**, 247, 9-17.
- Shokryazdan, P., Faseleh Jahromi, M., Liang, J. B., Ramasamy, K., Sieo, C. C., & Ho, Y. W. (2017). Effects of a *Lactobacillus salivarius* mixture on performance, intestinal health, and serum lipids of broiler chickens. **Public Library of Science ONE**, 12(5), 0175959.
- 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, 1209.
- Katarzyna, Ś., Bożena, C., Stefania, S., Joanna, C., (2019). The effect of probiotic supplementation on performance and the histopathological changes in liver and kidneys in broiler chickens fed diets with aflatoxin B1. **Toxins**, 11(2), 112.
- Sornplang, P., & Soikum, C. (2021). Effect of *lactobacillus* supplementation on growth performance in chickens. meat and reducing rotten bacteria contamination in chicken meat. **PSRU Journal of Science and Technology**, 6(2), 13-21.
- Sureshkumar, S., Lee, H. C., Jung, S. K., Kim, D., Oh, K. B., Yang, H., & Byun, S. J. (2021). Inclusion of *Lactobacillus salivarius* strain revealed a positive effect on improving growth performance, fecal microbiota and immunological responses in chicken. **Archives of Microbiology**, 203(2), 847-853.

- Takahashi, S., M. Tamai, S. Nakajima, H. Kato, H. Johno, T. Nakamura, & M. Kitamura. (2012). Blockade of adipocyte differentiation by cordycepin. **British Journal of Pharmacology**, 167: 561–575.
- Teame, T., Wang, A., Xie, M., Zhang, Z., Yang, Y., Ding, Q., & Zhou, Z. (2020). Paraprobiotics and postbiotics of probiotic lactobacilli, their positive effects on the host and action mechanisms: a review. **Frontiers in Nutrition**, 7, 570344.
- Teng, P.-Y., Choi, J., Yadav, S., Tompkins, Y., & Kim, W. K. (2021). Effects of low-crude protein diets supplemented with arginine, glutamine, threonine, and methionine on regulating nutrient absorption, intestinal health, and growth performance of Eimeria-infected chickens. **Poultry Science**, 100(11), 101427.
- Thumanu, K., Tanthanuch, W., Ye, D., Sangmalee, A., Lorthongpanich, C., Parnpai, R., & Heraud, P. (2011). Spectroscopic signature of mouse embryonic stem cell-derived hepatocytes using synchrotron Fourier transform infrared microspectroscopy. **Journal of Biomedical Optics**, 16(5), 057005-057005.
- Wang, B., Zhou, Y., Mao, Y., Gong, L., Li, X., Xu, S., & Li, W. (2021). Dietary supplementation with *Lactobacillus plantarum* ameliorates compromise of growth performance by modulating short-chain fatty acids and intestinal dysbiosis in broilers under *Clostridium perfringens* challenge. **Frontiers in Nutrition**, 8, 706148.
- Wang, J., Ishfaq, M., Guo, Y., Chen, C., & Li, J. (2020). Assessment of probiotic properties of *Lactobacillus salivarius* isolated from chickens as feed additives. **Frontiers in veterinary science**, 7, 415.
- Wang, R., Jiang, L., Zhang, M., Zhao, L., Hao, Y., Guo, H., & Ren, F. (2017). The adhesion of *Lactobacillus salivarius* REN to a human intestinal epithelial cell line requires s-layer proteins. **Scientific Reports**, 7(1), 1-10.
- Wei, Z., He, Z., Wang, T., Wang, X., Wang, T., & Long, M. (2023). *Lactobacillus salivarius* WZ1 Inhibits the inflammatory injury of mouse jejunum caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 by regulating the TLR4/NF- κ B/MyD88 inflammatory pathway and gut microbiota. **Microorganisms**, 11(3), 657.
- Willis, R. B., Montgomery, M. E. & Allen, P. R. (1996). Improved method for manual, colorimetric determination of total Kjeldahl nitrogen using salicylate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44,1804-1807.

- Xie, S., Zhao, S. Jiang, L. Lu, L. Yang, Q. & Yu, Q. (2019). *Lactobacillus reuteri* stimulates intestinal epithelial proliferation and induces differentiation into goblet cells in young chickens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 67,13758-13766.
- Xiong, J., Qiu, H., Bi, Y., Zhou, H. L., Guo, S., & Ding, B. (2018). Effects of dietary supplementation with tributyrin and coated sodium butyrate on intestinal morphology, disaccharidase activity and intramuscular fat of lipopolysaccharide-challenged broilers. **Brazilian Journal of Poultry Science**, 20(04), 707-716.
- Yousefi, M., Jonaidi, H., & Sadeghi, B. (2021). Influence of peripheral lipopolysaccharide (LPS) on feed intake, body temperature and hypothalamic expression of neuropeptides involved in appetite regulation in broilers and layer chicks. **British Poultry Science**, 62(1), 110-117.
- Zhang, G., Ma, L., & Doyle, M. P. (2007). *Salmonella* reduction in poultry by competitive exclusion bacteria *Lactobacillus salivarius* and *Streptococcus cristatus*. **Journal of Food Protection**, 70(4), 874-878.
- Zhong, Y., Wang, S., Di, H., Deng, Z., Liu, J., & Wang, H. (2022). Gut health benefit and application of postbiotics in animal production. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 13(1), 38.
- Zhu, N. H., Zhang, R. J., Wu, H., & Zhang, B. (2009). Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, xanthophyll deposition, and color of the meat and skin of broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, 18(3), 570-578.

ประวัติผู้เขียน

นายอานนท์ อยู่บู่ เกิดเมื่อวันที่ 9 มกราคม พ.ศ. 2540 ณ อำเภอร่องวาง จังหวัดแพร่ สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนสมเด็จพระพิทยาคม จังหวัดกาฬสินธุ์ และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2564 ต่อมาได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยระหว่างการศึกษาได้รับทุนสนับสนุนการศึกษาสำหรับนักศึกษา ระดับบัณฑิตศึกษา ภายใต้โครงการวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ประจำปีงบประมาณ 2563 นอกจากนี้ยังได้เข้าร่วมนำเสนอผลงานวิจัยในงานประชุมวิชาการนานาชาติ The 9th International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries (SAADC 2023) ซึ่งจัดขึ้น ณ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว อันเป็นเวทีสำคัญในการเผยแพร่ผลงานทางวิชาการระดับนานาชาติ และเป็นการเพิ่มพูนประสบการณ์ด้านการวิจัยในระดับสากล

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี