



ปัจจัยที่มีผลต่อประชากรจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง
กับภูมิคุ้มกันของเป็ดในประเทศไทย



ฉัตรินา เพ็ชรคง

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวศาสตร์
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

ปัจจัยที่มีผลต่อประชากรจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง
กับภูมิคุ้มกันของเป็ดในประเทศไทย



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวศาสตร์
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "ปัจจัยที่มีผลต่อประชากรจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร และการแสดงออกของยีนที่
เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของเป็ดในประเทศไทย"

ของ ธิติมา เพ็ชรคง

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณพร ทะพิงค์แก)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ เจริญสุข)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรศักดิ์ แก้วก่อง)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นรภัทร หวันเหลี่ยม)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาคภูมิ ทรัพย์สุนทร)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี ทาตระกุล)

อนุมัติ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ปัจจัยที่มีผลต่อประชากรจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของเป็ดในประเทศไทย
ผู้วิจัย	ฉติมา เพ็ชรคง
ประธานที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.รังสรรค์ เจริญสุข
กรรมการที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.วรศักดิ์ แก้วก่อง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นรภัทร หวันเหลี่ยม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาคภูมิ ทรัพย์สุนทร
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ ปร.ด. สัตวศาสตร์, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2566
คำสำคัญ	การแสดงออกของยีน, จุลินทรีย์ในไส้ติ่ง, เป็ด, โพรไบโอติก, สมรรถภาพการผลิต

บทคัดย่อ

อุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกโดยเฉพาะในเป็ดทางการค้ามีการศึกษาโครงสร้างประชากรของแบคทีเรียในทางเดินอาหาร การเพิ่มปริมาณและชนิดของแบคทีเรียจะไปพร้อม ๆ กับการเจริญเติบโตของตัวสัตว์ ซึ่งชนิดและปริมาณของแบคทีเรียจะแตกต่างกันตามชนิด อายุ พันธุกรรม สัตว์ การจัดการ อาหาร และสภาพแวดล้อม โดยการศึกษาที่ 1 เป็นการศึกษาผลของปัจจัยด้านพันธุกรรมและสภาพแวดล้อมจากรูปแบบการเลี้ยงเป็ดที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารในเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ โดยวางแผนการทดลองแบบ 2×2 แฟกทอเรียลสุ่มสมบูรณ์ มี 2 ปัจจัย ซึ่งปัจจัยแรก คือ สายพันธุ์เป็ดเนื้อและเป็ดไข่ และปัจจัยที่สอง คือ รูปแบบการเลี้ยง 2 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบโรงเรือนเปิดและรูปแบบโรงเรือนปิด สุ่มเก็บตัวอย่างม้ามและไส้ติ่งมาอย่างละ 5 ตัว รวมทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง พบว่าเป็ดเนื้อที่มีการเลี้ยงแบบโรงเรือนปิดมีระดับการแสดงออกของยีน *IFN- β* สูงกว่าเป็ดเนื้อที่มีการเลี้ยงแบบโรงเรือนเปิด ($P < 0.05$) สำหรับในเป็ดไข่ที่เลี้ยงแบบโรงเรือนเปิดมีระดับการแสดงออกของยีน *IFN- γ* และ *IL-10* สูงขึ้น แต่ระดับการแสดงออกของยีน *TLR3* ลดลง ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการเลี้ยงเป็ดทั้ง 2 รูปแบบ พบว่ารูปแบบการเลี้ยงแบบปิดมีระดับการแสดงออกของยีน *IFN- γ* สูง และการแสดงออกของยีน *TLR3* ลดลง ($P < 0.05$) แต่ไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน *IFN- α* , *IFN- β* , *IL-6*, *IL-10* และ *Mx* ($P > 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าการเลี้ยงแบบโรงเรือนเปิดทั้งเป็ดเนื้อและเป็ดไข่จะพบไฟลัม Spirochaetes ที่เป็นสาเหตุของโรค Avian Intestinal Spirochetosis (AIS) มากกว่ารูปแบบการเลี้ยงโรงเรือนปิด ส่วนการศึกษาที่ 2 เป็นการศึกษาผลของ

ปัจจัยด้านอาหารโดยการเสริมโพรไบโอติก *Bacillus toyonensis* BCT-7112^T ต่อลักษณะประสิทธิภาพการผลิต สัตว์งานวิทยาของลำไส้ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของเป็ดเนื้อ โดยทำการศึกษาในเป็ดเนื้อสายพันธุ์บารี่ จำนวน 200 ตัว วางแผนการทดลองแบบ CRD แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มทดลอง ในแต่ละกลุ่มทดลองมี 5 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว อาหารทดลองแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นอาหารควบคุมไม่มีการเสริมโพรไบโอติก และกลุ่มที่ 2-4 เป็นควบคุมที่มีการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ในอาหาร 3 ระดับ คือ 200, 500 และ 1000 mg/kg เก็บน้ำหนักตัวและปริมาณอาหารที่กินทุก ๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากการศึกษาพบว่า ในสัปดาห์ที่ 3 เป็ดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* 500 mg/kg มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น (BWG) และมีอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG) มากกว่าเป็ดเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม ($P < 0.05$) นอกจากนี้เป็ดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* 500 mg/kg มีน้ำหนักร้อยละของเนื้อสะโพกสูง แต่ในเนื้อออกมามีน้ำหนักร้อยละของการสูญเสียจากการละลายต่ำกว่าเป็ดเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม ($P < 0.05$) ส่วนการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ไม่มีผลต่อสัตว์งานวิทยาของลำไส้เล็กทั้ง 3 ส่วน เมื่อพิจารณาเป็ดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* มีการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ *IFN- α* , *IFN- β* , *IL-6*, *TLR3* และ *Mx* มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับเป็ดเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม ($P < 0.05$) และพบว่าไส้ติ่งเป็ดเนื้อทุกกลุ่มการทดลองที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T มีไฟลัมหลัก 5 อันดับแรก คือ Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria และ Deferribacteres ตามลำดับ จากการวิเคราะห์แบบ α -diversity และ β -diversity แสดงให้เห็นว่าเป็ดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T มีผลต่อองค์ประกอบและความหลากหลายของจุลินทรีย์ ดังนั้นการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T นี้จึงเป็นประโยชน์ต่อการทำงานของโฮสต์ และความอุดมสมบูรณ์ที่เพิ่มขึ้นในไส้ติ่งของเป็ดเนื้อ ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า รูปแบบการเลี้ยงและอาหารมีผลต่อจุลินทรีย์ในไส้ติ่งของเป็ด ซึ่งสามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานใช้ในการอ้างอิงสำหรับชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในไส้ติ่งของเป็ดในด้านปัจจัยทางพันธุกรรม อาหาร และสภาพแวดล้อมได้

Title	FACTORS AFFECTING ON GUT MICROBIOTA AND IMMUNE-RELATED GENE EXPRESSION OF DUCK IN THAILAND
Author	Thitima Pechrkong
Advisor	Associate Professor Rangsun Charoensook, Ph.D.
Co-Advisor	Associate Professor Worasak Kaewkong, Ph.D. Assistant Professor Noraphat Hwanhlem, Ph.D. Assistant Professor Pakpoom Subsoontorn, Ph.D.
Academic Paper	Ph.D. Dissertation in Animal Science - (Type 2.1), Naresuan University, 2023
Keywords	Cecal microbiota, Duck, Immune-related gene expression, Probiotics, Productive performance

ABSTRACT

The poultry industry, particularly the production of commercial ducks, has been studied for its structural and bacterial population in the gastrointestinal tract (GIT). Bacteria have increased in both quantity and type, paralleling bird growth performance. There are differences in the quantity and type of cecal microbes based on age, breed, management, diet, and environment. In this study, we investigated the breed and environment factors from the rearing system on immune-related gene expression and cecal microbiota diversity in laying and meat ducks. Ducks were randomly assigned to 2 x 2 factorial in a complete randomized design (CRD) with two breeds (laying and meat ducks) and two rearing systems (extensive and intensive systems). Samples were collected from the spleen and cecal contents of five birds in each group (n = 20). The results showed that *IFN-β* gene expression levels were higher in meat ducks raised in intensive systems than in those raised in extensive systems ($P < 0.05$). In laying ducks raised in the extensive system, there was a significant increase in *IFN-γ* and *IL-10* gene expression ($P < 0.05$), but a significant decrease in *TLR3* gene expression ($P < 0.05$). The expression of *IFN-α*, *IFN-β*, *IL-6*, *IL-10*, and *Mx* genes was not affected ($P > 0.05$). Furthermore, the abundance of the

Spirochaetes phylum was found to be higher in the extensive system for both laying and meat breeder ducks compared to the intensive system. This phylum is known to be associated with Avian Intestinal Spirochetosis (AIS), a disease affecting the intestinal tract of birds. In order to investigate the effects of supplementing probiotics (*Bacillus toyonensis* BCT-7112^T) on growth performance, small intestinal morphology, immune-related gene expression and cecal microbiota in meat ducks. Two hundred day-old Barbary ducks were randomly allotted to four treatments with five replicates of 10 birds on the basis of equal average body weight in CRD. Dietary treatments were T1 basal diet; control, T2-4; basal diet supplemented with 200, 500 and 1000 mg/kg *B. toyonensis* BCT-7112^T. At 3 weeks, *B. toyonensis* supplementation at 500 mg/kg improved body weight gain (BWG) and average daily gain (ADG) compared to the control group ($P < 0.05$). For the results of meat quality, the percentage of meat at the thigh of the *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 mg/kg group was higher than the control group ($P < 0.05$), but a lower thawing loss percentage was found in the breast muscle of the *B. toyonensis* 500 mg/kg group than the control group ($P < 0.05$). There was no difference in small intestine morphology between groups of *B. toyonensis* BCT-7112^T ($P > 0.05$). Furthermore, gene expression of the major pro-inflammatory cytokines *IFN- α* , *IFN- β* , *IL-6*, *TLR3* and *Mx* decreased in ducks fed a *B. toyonensis* BCT-7112^T diet compared to the control group ($P < 0.05$). This study indicated that ducks fed diets supplemented with *B. toyonensis* BCT-7112^T, Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria and Deferribacteres were the top five most abundant phyla. The results of α and β diversity analyses show that the *B. toyonensis* BCT-7112^T supplements affected composition and diversity of the microbial population in the ceca of ducks. Therefore, *B. toyonensis* BCT-7112^T supplementation will benefit host activity and increase the richness of cecal meat ducks.

In conclusion, the rearing system and diet affect the cecal microbes of ducks and growth performance. This study provide an important information for the quantity and diversity of cecal microbes in ducks among breed, diet and environment factors.



ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วย ความกรุณา ช่วยเหลือ แนะนำ และให้คำปรึกษาอย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร. รังสรรค์ เจริญสุข ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้อุทิศสละเวลาอันมีค่ามาเป็น ที่ปรึกษา พร้อมทั้งให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการวิทยานิพนธ์อันประกอบไปด้วย รองศาสตราจารย์ ดร. วรศักดิ์ แก้วก่อง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นรภัทร หวันเหลี่ยม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาคภูมิ ทรัพย์สุนทร ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำถ่ายทอดความรู้ แนวคิด และวิธีการ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์ ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณการสนับสนุนทุนวิจัยบัณฑิตศึกษา ด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร ภายใต้สัญญารับทุนอุดหนุนการวิจัยเลขที่ HRD6305058 จากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ 2563

ขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิ และผู้เชี่ยวชาญทุกท่านที่กรุณาตรวจสอบคุณภาพของเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย และได้กรุณาปรับปรุง แก้ไขข้อบกพร่อง และให้คำแนะนำในการสร้างเครื่องมือให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมทั้งบุคคลที่ผู้วิจัยได้อ้างอิงทางวิชาการตามที่ปรากฏในบรรณานุกรม

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ของผู้วิจัยที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้องนิสิตสาขาวิชาสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีอาหารสัตว์ทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำและส่งเสริมกำลังใจตลอดมา นอกจากนี้ยังมีผู้ที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลืออีกหลายท่าน ซึ่งผู้วิจัยไม่สามารถกล่าวนามในที่นี้ได้หมด จึงขอขอบคุณทุกท่านเหล่านั้นไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอบคุณทุก ๆ สิ่งมีชีวิตที่อุทิศให้กับงานวิจัยของข้าพเจ้า คุณค่าทั้งหลายที่ได้รับจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแด่ผู้มีพระคุณทุก ๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญ และให้ความรู้กับผู้ที่สนใจบ้างไม่มากก็น้อย

ธิติมา เพ็ชรคง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุุณุปการ.....	ช
สารบัญ.....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
จุดมุ่งหมายของการศึกษา.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
สมมุติฐานของการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
การใช้ Antibiotic Growth Promoters (AGPs) ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีก.....	5
จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก.....	5
ผลของจุลินทรีย์ต่อการดูดซึมสารอาหารในทางเดินอาหารสัตว์ปีก.....	12
การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ปีก.....	16
การศึกษาประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดในทางเดินอาหารสัตว์ปีก ด้วยเทคนิค Microbiome analysis.....	19
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	21

อุปกรณ์และเครื่องมือ	21
สารเคมีและเอนไซม์	22
สารละลาย	23
การศึกษาปัจจัยด้านรูปแบบการเลี้ยงและพันธุกรรม	23
กรณีศึกษา: ผลของรูปแบบการเลี้ยงเปิดที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ ภูมิคุ้มกัน และความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในระบบทางเดิน อาหารในเปิด	23
การศึกษาปัจจัยด้านอาหาร	24
กรณีศึกษา: ผลของการเสริม <i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 ^T) ในเปิดต่อลักษณะ ประสิทธิภาพการผลิต ลักษณะซาก คุณภาพเนื้อ สัตฐานวิทยาลัย การ แสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และความหลากหลายของ แบคทีเรียในทางเดินอาหาร	24
สัตว์ทดลองและการวางแผนการทดลอง	24
การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน	30
การวิเคราะห์ข้อมูล	31
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติปัจจัยด้านรูปแบบการเลี้ยง	31
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติปัจจัยด้านอาหาร	31
การศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร (gut microbiota) เปิดเนื้อด้วย เทคนิค High-Throughput Sequencing (Next-Generation Sequencing; NGS)	32
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย	35
ผลของรูปแบบการเลี้ยงเปิดที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และ ความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารในเปิด	35

ผลของรูปแบบการเลี้ยงเป็ดที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันใน เป็ด	35
ผลของรูปแบบการเลี้ยงเป็ดที่มีต่อความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในระบบ ทางเดินอาหารในเป็ด.....	37
ผลของการเสริม <i>B. toyonensis</i> BCT-7112 ^T ในเป็ดต่อลักษณะประสิทธิภาพการผลิต ลักษณะซาก คุณภาพเนื้อ สันฐานวิทยาลัยการศึกษาระดับปริญญาโท การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ ภูมิคุ้มกัน และความหลากหลายของแบคทีเรียในทางเดินอาหาร.....	53
ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตในเป็ดเนื้อ	53
ลักษณะซาก (carcass traits).....	56
คุณภาพเนื้อ (meat quality).....	58
สันฐานวิทยาลัยการศึกษาระดับปริญญาโทของเป็ดเนื้อ	60
ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกล้ามเนื้อของเป็ดเนื้อ	61
องค์ประกอบของไมโครไบโอมในลำไส้ตั้งในเป็ดเนื้อ.....	63
บทที่ 5 บทสรุป.....	78
สรุปผลการวิจัย.....	78
ข้อเสนอแนะ	80
บรรณานุกรม.....	81
ภาคผนวก.....	101
ประวัติผู้วิจัย	126
ประวัติผู้วิจัย	132

สารบัญตาราง

หน้า

Table 1 Spatial distribution of most common and abundant bacterial taxa (phylum, order (o), family (f), genus (g) in the gastro-intestinal tract of chickens irrespective of age, diet and technique differences.....	7
Table 2 Probiotics studied for application in animal feed.....	11
Table 3 Effects of supplementing the diets offered to ducks with <i>Bacillus subtilis</i> on small intestinal morphology (28 d).....	14
Table 4 Ingredient composition and nutritive value of the basal diets for the experimental meat ducks.....	25
Table 5 Sample collections.....	27
Table 6 The primer sequences of immune related genes.....	32
Table 7 The microflora microbial diversity index (Chao, ACE, Simpson, Shannon, and Coverage) of each duck.....	39
Table 8 Effect of <i>B. toyonensis</i> BCT-7112 ^T supplemented diets on growth performance of ducks during the experimental period (1-56 days old).....	53
Table 9 Effect of <i>B. toyonensis</i> BCT-7112 ^T supplemented diets on carcass yield and visceral organs (g/100 body weight) in meat ducks at 56 days old.....	57
Table 10 Effect of <i>B. toyonensis</i> BCT-7112 ^T supplemented diets on water-holding capacity, color, and pH of meat of the ducks at 56 days old.....	59
Table 11 Effect of dietary <i>B. toyonensis</i> BCT-7112 ^T on intestinal morphological alterations of Barbary ducks during experimental period (56 days old).....	60

สารบัญญภาพ

หน้า

Figure 1 The major bacterial habitats and concentration in the gastrointestinal tract of chicken (Crop, Gizzard, Ileum, Caeca, Cloca).....	7
Figure 2 Flow diagram of the current research design. The ducks in MDEx, MDIn, LDEx, and LDIn groups were of two different breeds, as they were reared under different conditions.....	24
Figure 3 The relative mRNA expression of immune-related gene in the spleen of ducks between the intensive and extensive. The relative expression of meat ducks (a) and laying ducks (b). Data are expressed as relative expression of <i>IFN-α</i> , <i>IFN-β</i> , <i>IFN-γ</i> , <i>IL-6</i> , <i>IL-10</i> , <i>TLR3</i> and <i>Mx</i> gene normalized to expression of GAPDH. Differences were detected with student's <i>t</i> -test were considered significant as follow: * <i>P</i> < 0.05.....	36
Figure 4 The relative mRNA expression of immune-related gene in the spleen of ducks between the intensive and extensive. The relative expression duck breeds (a) and rearing system (b). Data are expressed as relative expression of <i>IFN-α</i> , <i>IFN-β</i> , <i>IFN-γ</i> , <i>IL-6</i> , <i>IL-10</i> , <i>TLR3</i> and <i>Mx</i> gene normalized to expression of GAPDH. Differences were detected with student's <i>t</i> -test were considered significant as follow: * <i>P</i> < 0.05.	37
Figure 5 Statistics of each sample OTUs clustering and annotation. Total Tags (red): refers to the number of total tags each sample; Unique Tags (orange): refers to the number of tags that can't be clustering to OTUs (sequence cannot be clustered OTUs will not be used for subsequent analysis); Taxon Tags (blue): refers to the number of Tags for building OTUs and annotation information; Unclassified Tags (tea green): refers to the number of Tags without annotation information; OTUs (purple): refers to the Number of OTUs in each sample. Ducks in MDEx (MDEx01- MDEx05) and LDEx (LDEx01- LDEx05) groups had rearing extensive system, while birds in MDIn (MDIn01- MDIn05) and LDIn (LDIn01- LDIn05) group were rearing intensive system....	38

Figure 6 The α -diversity including Reads ACE (A), Shannon (B), Simpson (C), and Chao1 (D) in duck breeds on different rearing systems.....40

Figure 7 Species richness and diversity analysis of different groups. (a) Species accumulation curves of the current study. (b) The rank abundance curve of different duck samples in rearing system. (c) The rarefaction curve of all the birds in rearing system. Ducks in MDEX (MDEX01- MDEX05) and LDEX (LDEX01- LDEX05) groups had rearing extensive system, while birds in MDIn (MDIn01- MDIn05) and LDIn (LDIn01- LDIn05) group were rearing intensive system.41

Figure 8 Species classification tree in the samples. Different colors fan represented different samples in circle. The size of Fan refers to the microorganism classification of relative abundance in the sample. Ducks in MDEX (MDEX01- MDEX05) and LDEX (LDEX01- LDEX05) groups had rearing extensive system, while birds in MDIn (MDIn01- MDIn05) and LDIn (LDIn01- LDIn05) group were rearing intensive system.42

Figure 9 Comparative analysis of the beta diversity heatmap of Beta diversity indices. The difference coefficient in MDEX, MDIn, LDEX and LDIn groups was indicated by the number in each square. The disparity in species diversity decreased with decreasing difference coefficient. The upper and lower numbers in the same square stand for the weighted and Unweighted UniFrac distances (mean \pm SEM), respectively. Ducks in MDEX (MDEX01- MDEX05) and LDEX (LDEX01- LDEX05) groups had rearing extensive system, while birds in MDIn (MDIn01- MDIn05) and LDIn (LDIn01- LDIn05) group were rearing intensive system.....43

Figure 10 Beta diversity (weighted UniFrac) among 4 strains. Beta diversity indexes were measured based on weighted UniFrac and unweighted UniFrac distances. The upper numbers in the grid represent the weighted UniFrac; and the lower numbers in the grid represent the unweighted UniFrac distances, respectively. Ducks in MDEX (MDEX01- MDEX05) and LDEX (LDEX01- LDEX05) groups had rearing extensive system, while birds in MDIn (MDIn01- MDIn05) and LDIn (LDIn01- LDIn05) group were rearing intensive system.44

Figure 11 Effects of rearing systems on the cecal microbiota of meat and layer ducks.
45

Figure 12 Effects of rearing systems on the cecal microbiota of meat and layer ducks. Differential microbes in cecal of ducks by t-test. MDEx: meat duck extensive; MDIn: meat duck intensive; LDEx: laying duck extensive and LDIn: laying duck intensive.....46

Figure 13 Beta-diversity analysis by weighted UniFrac distances among samples from the 20 samples (4 groups). Hierarchical dendrogram and cecal microbial composition for each sample at the phylum level.....47

Figure 14 The microbial community structure at phylum level: (a) different ducks; (b) different groups.....48

Figure 15 The microbial community structure at genus level: (a) different ducks; (b) different groups.....49

Figure 16 Heat map analysis of samples from the four groups. A heat map showing the abundances of the top 35 most abundant genera were clustered and plotted using R software. Red represents genera with relatively higher abundances in the corresponding sample, whereas blue represents genera with relatively lower abundances.....50

Figure 17 Principal Component Analysis (PCA) of microbial community of the ducks in MDEx, MDIn, LDEx and LDIn groups.....51

Figure 18 The effect of *B. toyonensis* BCT-7112^T supplementation on relative RNA expression in the spleen of meat ducks. (a) At 14 day of age, (b) At 35 day of age, and (c) At 56 day of age. Differences were detected with student’s t-test were considered.....62

Figure 19 Species classification tree in the samples. Different colors fan represented different samples in circle. The size of Fan refers to the microorganism classification of relative abundance in the sample. Ducks in MCONT had meat duck control group,

while birds in M500 and M1K were meat duck supplemented probiotic 500 mg/kg and 1000 mg/kg.64

Figure 20 The top 10 phylum relative abundance of microbiota community indicate by histogram. (A) Lanes control.01-05, meat duck of control group and lanes 500 mg/kg.01-05, meat duck supplemented with *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 mg/kg group. (B) The top 10 phylum with the highest abundance in both groups.65

Figure 21 The top 10 phylum relative abundance of microbiota community indicate by histogram. (A) Lanes control.01-05, meat duck of control group and lanes 1000 mg/kg. 01-05, meat duck supplemented with *B. toyonensis* BCT-7112^T 1000 mg/kg group. (B) The top 10 phylum with the highest abundance in both groups.67

Figure 22 The top 10 genus relative abundance of microbiota community indicate by histogram. (A) Lanes control.01-05, meat duck of control group and lanes 500 mg/kg. 01-05, meat duck supplemented with *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 mg/kg group. (B) The top 10 phylum with the highest abundance in both groups.68

Figure 23 The top 10 genus relative abundance of microbiota community indicate by histogram. (A) Lanes control.01-05, meat duck of control group and lanes 1000 mg/kg. 01-05, meat duck supplemented with *B. toyonensis* BCT-7112^T 1000 mg/kg group. (B) The top 10 phylum with the highest abundance in both groups.69

Figure 24 Principal component analysis (PCA) of the microbial community of the ducks in 500 mg/kg, 1000 mg/kg and control groups.70

Figure 25 Heat map analysis of 35 most abundant phyla and genera of each bird was carried out in Control (Control.01- Control.05) group with basal diet and 500 mg/kg (500ppm.01-500ppm.05) group *B. toyonensis* BCT-7112^T supplement. Notes: Plotted by sample name on the X-axis and the Y-axis represents the phylum. The absolute value of 'Z' represents the distance between the raw score and the mean of the standard deviation. 'Z' is negative when the raw score is below the mean, and vice versa (rank from -2 to 2).72

Figure 26 Heat map analysis of 35 most abundant phyla and genera of each bird was carried out in Control (Control.01- Control.05) group with basal diet and 1000 mg/kg (1000ppm.01-1000ppm.05) group *B. toyonensis* BCT-7112^T supplement. Notes: Plotted by sample name on the X-axis and the Y-axis represents the phylum. The absolute value of 'Z' represents the distance between the raw score and the mean of the standard deviation. 'Z' is negative when the raw score is below the mean, and vice versa (rank from -2 to 2).....73

Figure 27 โรงเรือนเปิดไข่แบบเปิด (ภาพบน) เก็บตัวอย่างม้ามในเปิดไข่ (ภาพล่าง)..... 105

Figure 28 โรงเรือนเปิดเนื้อแบบเปิด (ภาพบน) เก็บตัวอย่างม้ามและไส้ติ่งในเปิดเนื้อ (ภาพล่าง)..... 106

Figure 29 แผนผังการทดลองในโรงเรือน..... 107

Figure 30 ทำความสะอาด ซ่อมโรงเรือน และเตรียมโรงเรือน..... 108

Figure 31 พ่นยาฆ่าเชื้อโรงเรือนเตรียมไฟกกลูกเปิด (ภาพบน) เซ็นเซอร์วัดอุณหภูมิและความชื้น (ภาพกลาง) ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (ภาพล่าง)..... 109

Figure 32 ติดเบอร์ซา (ภาพบน) ชั่งน้ำหนัก (ภาพกลาง) เตรียมน้ำและอาหารลูกเปิดอายุ 1 วัน (ภาพล่าง)..... 110

Figure 33 อาหารเปิดเนื้อระยะต่าง ๆ และชั่งอาหารเปิดเนื้อทุก ๆ สัปดาห์ 111

Figure 34 การจัดการเปิดเนื้อที่อายุ 0 – 7 วัน..... 112

Figure 35 การจัดการเปิดเนื้อที่อายุ 8 - 14 วัน 113

Figure 36 การจัดการเปิดเนื้อที่อายุ 15 – 21 วัน 114

Figure 37 การจัดการเปิดเนื้อที่อายุ 22 – 28 วัน 115

Figure 38 การจัดการเปิดเนื้อที่อายุ 29 – 35 วัน 116

Figure 39 การจัดการเปิดเนื้อที่อายุ 36 – 42 วัน 117

Figure 40 การจัดการเปิดเนื้อที่อายุ 43 – 49 วัน 118

Figure 41 การจัดการเปิดเนื้อที่อายุ 50 – 56 วัน 119

Figure 42 อุปกรณ์เก็บตัวอย่างซาก (ภาพบน) ตัวอย่างม้ามเปิดเนื้อที่อายุ 14 วัน (ภาพล่าง)..... 120

Figure 43 เก็บตัวอย่างม้ามเปิดเนื้อที่อายุ 35 วัน (ภาพบน) และตัวอย่างม้ามเปิดเนื้อที่อายุ 56 วัน (ภาพล่าง) 121

Figure 44 การสูญเสียน้ำขณะเก็บ (Drip loss)..... 122

Figure 45 การเตรียมอุปกรณ์เก็บตัวอย่างสัตว์อย่างสัตวบาลวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 123



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกจัดเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยที่มีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง หนึ่งในปศุสัตว์ที่กำลังเป็นที่นิยม คือ เป็ดเนื้อ และเป็ดไข่ เนื่องจากมีผู้นิยมบริโภคเพิ่มมากขึ้น ขณะที่เกษตรกรผู้เลี้ยงเป็ดมีผลผลิตไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ทำให้มีการเร่งการผลิตและทำการเลี้ยงภายใต้ระบบปิดที่มีความหนาแน่น ซึ่งส่งผลเสียต่อสุขภาพและประสิทธิภาพการผลิตของเป็ด ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการหาวิธีการต่าง ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตให้เพียงพอและตรงตามความต้องการของตลาด ผู้เลี้ยงสัตว์จึงนิยมเสริมยาปฏิชีวนะในอาหารเพื่อใช้เป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโต (Antibiotic Growth Promoters; AGPs)หวังผลในการควบคุมการก่อโรคจากจุลชีพในร่างกายสัตว์ ส่งผลให้ช่วยในเรื่องการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว และประสิทธิภาพการใช้อาหาร แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นประจำย่อมส่งผลถึงสมดุลของประชากรจุลชีพในทางเดินอาหาร ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของสัตว์ โดยมีผลต่อรูปลักษณะของต่อทางเดินอาหาร โภชนะ การเกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร และภูมิคุ้มกันโรค โดยจุลชีพในทางเดินอาหารจะช่วยป้องกันไม่ให้จุลชีพก่อโรคมายึดเกาะผนังลำไส้ และยังช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ทำให้สัตว์มีสุขภาพที่ดีและให้ผลผลิตได้อย่างเต็มที่

มีปัจจัยหลายประการ ที่ส่งผลกระทบต่อสมดุลของประชากรจุลชีพในทางเดินอาหารสัตว์ปีก เช่น อาหาร อายุของสัตว์ปีก การให้ยาปฏิชีวนะ และการติดเชื้อก่อโรค นอกจากนี้ปัจจัยด้านพันธุกรรมและสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงก็เป็นส่วนที่สำคัญด้วยเช่นกัน โดยภายใต้สภาวะแวดล้อมปกติในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีกประกอบด้วยจุลชีพประจำถิ่นประมาณ 400-500 สายพันธุ์ที่แตกต่างกันรวมจำนวนทั้งหมดประมาณ 10^{14} CFU/g ซึ่งกระจายไปทั่วระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก การใช้ยาปฏิชีวนะจำนวนมากและต่อเนื่องเป็นเวลานาน อาจทำให้เกิดผลเสียต่าง ๆ เช่น ยาปฏิชีวนะที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์อาจส่งผลถึงผู้บริโภค เมื่อสะสมเป็นเวลานานอาจทำให้เกิดการดื้อยา นอกจากนี้ยาปฏิชีวนะที่ตกค้างในน้ำเสียจากฟาร์มปศุสัตว์ อาจปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมส่งผลต่อความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ด้วยเหตุนี้นานาชาติโดยเฉพาะประเทศในกลุ่มสหภาพยุโรปจึงได้วางมาตรการยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ประเทศไทยในฐานะประเทศผู้ผลิตและส่งออกสินค้าเกษตรรายใหญ่ของโลกประเทศหนึ่ง จำเป็นที่

จะต้องมีมาตรการเพื่อการปรับปรุงวิธีการผลิตสัตว์ เพื่อลดปริมาณหรือยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ต่อไป

ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกในปัจจุบันนั้นได้มีการนำสารเสริมจากธรรมชาติมาใช้เพื่อกระตุ้นประสิทธิภาพการผลิต โปรไบโอติกจัดเป็นหนึ่งในสารเสริมในอาหารสัตว์ที่ได้ถูกนำมาใช้เป็นทางเลือกสำหรับการปรับปรุงคุณสมบัติและปรับสมดุลจุลินทรีย์ลำไส้ในสัตว์ปีก เพื่อลดการใช้ยาปฏิชีวนะ ในการผลิตสัตว์ปีกมีการนำโปรไบโอติกมาเสริมลงในอาหารสัตว์ เพื่อเสริมสร้างความแข็งแรง ช่วยปรับสภาพภายในลำไส้ของสัตว์ให้ดีขึ้นทำให้ลำไส้มีความเป็นกรดเพิ่มมากขึ้น โดยการผลิตกรดอินทรีย์และยังมีการหลั่งสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคต่าง ๆ รวมทั้งช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทำให้สัตว์มีสุขภาพดี และเพิ่มภูมิต้านทานให้สัตว์ แต่ก็ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายด้านทั้งในเรื่องระดับที่เหมาะสม ความสามารถทนทานต่อการเก็บรักษา ความร้อนจากกระบวนการแปรรูปอาหารสัตว์ และความเป็นกรดในทางเดินอาหาร จึงทำให้ผู้ผลิตโปรไบโอติกพยายามที่จะค้นหาจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ที่จะทนทานต่อข้อจำกัดดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามยังขาดข้อมูลสำคัญหลายด้าน ทั้งในด้านระดับการเสริมในอาหารที่เหมาะสม การตอบสนองของระบบยีนต่าง ๆ ทั้งทางด้านสุขภาพและการเจริญเติบโต รวมทั้งความหลากหลายของประชากรแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร (Gut microbiota) ของเป็ด ซึ่งจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศประกอบการศึกษา ซึ่งปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิค High-Throughput sequencing (Next-generation sequencing; NGS) ซึ่งสามารถหาลำดับเบสทั้งจีโนมของสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีการหาลำดับเบสแบบขนานที่ทำได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ มีความจำเพาะสูง ถูกต้อง แม่นยำ รวดเร็ว และยังสามารถได้ข้อมูลทางพันธุกรรมจำนวนมาก เมื่อเทียบกับวิธีการแบบดั้งเดิม

แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยทางด้านการศึกษากการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (immune-related gene expression) และการวิเคราะห์ชนิดและความหลากหลายของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร (gut microbiome analysis) จากการตอบสนองต่อจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารในสัตว์เศรษฐกิจ ยังมีข้อมูลอยู่น้อยมาก การศึกษาในครั้งนี้นอกจากจะเป็นการค้นพบความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในทางเดินอาหารเป็ดแล้ว ยังจะเป็นประโยชน์ต่อการหาแนวทางในการส่งเสริมสุขภาพทางเดินอาหาร (gut health) และหาสิ่งทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์เศรษฐกิจต่อไป

จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาผลของปัจจัยด้านพันธุกรรมและสภาพแวดล้อมจากรูปแบบการเลี้ยงเป็ดที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และความหลากหลายของประชากรจุลชีพในระบบทางเดินอาหารในเป็ดเนื้อและเป็ดไข่
2. เพื่อศึกษาผลของปัจจัยด้านอาหารโดยการเสริมโพรไบโอติกต่อลักษณะประสิทธิภาพการผลิต การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และความหลากหลายของประชากรจุลชีพในทางเดินอาหารในเป็ดเนื้อ

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ปัจจัยด้านพันธุกรรมกับสภาพแวดล้อมจากรูปแบบการเลี้ยงเป็ดที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างจากฟาร์มเกษตรกรในจังหวัดพิษณุโลก ได้แก่ ตัวอย่างม้าม เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และตัวอย่างของเหลวที่อยู่ในไส้ติ่ง เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของเป็ด
2. ปัจจัยด้านอาหารโดยการเสริมโพรไบโอติกต่อลักษณะประสิทธิภาพการผลิต การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารในเป็ดเนื้อ โดยเลี้ยงเป็ดสายพันธุ์บารี่เพศผู้ทั้งหมด 200 ตัว สิ้นสุดการทดลองที่อายุ 8 สัปดาห์ เก็บตัวอย่างซาก เพื่อวิเคราะห์ลักษณะซากและคุณภาพเนื้อ ตัวอย่างลำไส้ส่วนต่าง ๆ เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาทางเดินอาหาร รวมทั้งตัวอย่างม้าม เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และตัวอย่างของเหลวที่อยู่ในไส้ติ่ง เพื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของเป็ดเนื้อ

สมมุติฐานของการวิจัย

1. พันธุกรรมและสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน มีผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และส่งผลต่อความหลากหลายของประชากรจุลชีพในระบบทางเดินอาหาร สามารถใช้เป็นแนวทางในการส่งเสริมให้เกษตรกรผู้เลี้ยงเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ ในการลดอัตราการตายของเป็ดที่เกิดจากโรค และลดการใช้ยาปฏิชีวนะได้

2. การเสริมโพรไบโอติกมีผลลักษณะการเจริญเติบโต การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และส่งผลต่อความหลากหลายของประชากรจุลชีพในระบบทางเดินอาหารในเป็ดเนื้อ สามารถใช้เป็นหนึ่ง ในสารเสริมทางเลือก สำหรับใช้ในการการส่งเสริมสุขภาพทางเดินอาหาร (gut health) ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมการผลิตเป็ดได้



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การใช้ Antibiotic Growth Promoters (AGPs) ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีก

ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) มีคุณสมบัติเป็นสารที่ใช้ฆ่าหรือหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและมีบทบาทสำคัญมากในยุคของการผลิตสัตว์ที่มีการแข่งขันสูง ในช่วงแรกยาปฏิชีวนะจึงถูกใช้ในอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์เพื่อควบคุมโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรีย และป้องกันโรคแทรกซ้อนจากเชื้อแบคทีเรียที่อาจเกิดขึ้นหลังการติดเชื้อไวรัสเท่านั้น (Neospark, 2007) จึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะที่หลากหลายย่อมส่งผลให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรียที่ก่อโรค สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรค หรือทำให้เชื้อโรคนั้น ๆ ถูกทำลายได้ ยาปฏิชีวนะใช้ในการป้องกันและรักษาโรค เช่น โรคปอดบวม หลอดลมอักเสบ การอักเสบต่าง ๆ มีผลหน่วง โรคทางเดินอาหาร โลหิตเป็นพิษ เป็นต้น ยาในกลุ่มนี้ เช่น penicillins, streptomycin, penicillins, ampicillin, kanamycin, tetracycline, oxytetracycline, clortetracycline และ neomycin เป็นต้น เพื่อป้องกันการติดเชื้อโรค และเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามได้มีการแนะนำว่าการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่องอาจทำให้แบคทีเรียเกิดการดื้อยาได้ และส่งผลให้เกิดการถ่ายโอนเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคไปสู่ตัวสัตว์เอง และผู้บริโภคได้ เชื้อที่ดื้อยาจากสัตว์สามารถทำให้เกิดโรคในคน เช่น *Escheri* (Xiao et al., 2014) ต่อมาพบว่ายาปฏิชีวนะถูกนำมาใช้เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตในการผลิตสัตว์ (Antimicrobial growth promoters; AGPs) ทำให้ผู้บริโภคมีความกังวลมากขึ้นเกี่ยวกับการใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ เนื่องจากตรวจพบสารตกค้างในผลิตภัณฑ์ทางปศุสัตว์ ส่งผลให้ในหลาย ๆ ประเทศมีการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต ในปี ค.ศ. 2006 สหภาพยุโรปจึงได้ออกประกาศกฎหมายห้ามใช้ยาปฏิชีวนะในระดับ AGPs ในอาหารสัตว์ (Cogliani et al., 2011) เพราะยาปฏิชีวนะเป็นสารที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์จะมีฤทธิ์ไปทำลายเชื้อจุลินทรีย์ทั้งที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษ

ซึ่งในระบบอุตสาหกรรมเลี้ยงสัตว์ปีกจะมีการเลี้ยงที่หนาแน่นเพื่อลดต้นทุนในการผลิต ทำให้สัตว์เกิดความเครียด เกิดโรค ไม่สามารถแก้ไขปัญหาได้ทัน ทำให้เกิดการสูญเสียค่อนข้างมาก

จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก

ไมโครไบโอมตา หรือเดิมเรียกว่า เชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normal flora) ภายใต้สภาวะแวดล้อมปกติจะประกอบไปด้วยแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัสของแบคทีเรีย ซึ่งมีอยู่ทั่วร่างกายบริเวณที่

สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมภายนอก ได้แก่ บริเวณช่อง โพรง และเยื่อต่างๆ เช่น ผิวหนัง ปาก ตา หู จมูก อวัยวะสืบพันธุ์ ทางเดินหายใจ และทางเดินอาหาร ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีกประกอบด้วย จุลินทรีย์ 400-500 สายพันธุ์ที่แตกต่างกันของจำนวนทั้งหมด 10^{14} CFU/g จุลินทรีย์ในทางเดินอาหารสัตว์ปีกพบความแตกต่างของชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ (Table 1) โพรไบโอติกทำให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ที่ดี ควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้สัตว์ เพิ่มประสิทธิภาพการย่อยและการดูดซึมสารอาหาร ช่วยเพิ่มผลผลิต และลดการใช้ยาปฏิชีวนะ (คิกฤทธิ์ ศีลาฉาย 2561) แต่บริเวณทางเดินอาหารส่วนปลายมีความหนาแน่นและหลากหลายของไมโครไบโอตา กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่มีมากที่สุดในร่างกาย เรียกว่า Gut microbiota ส่วน Microbiome หมายถึง สารพันธุกรรมทั้งหมดของไมโครไบโอตา ไฟล์มหลักทั้ง 4 ของไมโครไบโอตา ได้แก่ Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria และ Proteobacteria มีสัดส่วนแตกต่างกันออกไป ในความหลากหลายของไมโครไบโอตาในสัตว์แต่ละชนิดถูกกำหนดด้วยหลายปัจจัย ได้แก่ สิ่งแวดล้อม อาหาร วัคซีน การจัดการสายพันธุ์ เพศ และอายุ เป็นต้น

Vasai *et al.* (2014) ได้ศึกษาการเสริม *L. sakei* คือ โพรไบโอติกที่มีผลต่อจุลินทรีย์ในลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) และไส้ติ่ง (cecal) ของเป็ดสายพันธุ์ mule โดยใช้เทคนิคขั้นสูง (NGS) นำยีน 16s rRNA ตรวจสอบลำดับเบสเพื่อระบุชนิดของจุลินทรีย์ในระดับไฟล์มและคลาส พบว่าก่อนการเสริมด้วย *Lactobacillus sakei* ในอาหารทำให้ตัวอย่างในลำไส้เล็กส่วนปลายมีแบคทีเรียก่อโรค *Clostridia*, *Bacteroidia* และ *Gammaproteobacteria* มากกว่าร้อยละ 80 ขึ้นไป ส่วนไส้ติ่งมี *Clostridia* และ *Bacteroidia* ประมาณร้อยละ 85 แต่หลังจากที่มีการเสริม *L. sakei* ในอาหารทำให้ลำไส้เล็กส่วนปลายถูกกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงปรับสมดุลของ *firmicutes* โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของ *Lactobacillus* ที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้การเสริมด้วย *L. sakei* อาจช่วยปรับปรุงสุขภาพของสัตว์และอาจเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมสัตว์ปีก

ประชากรจุลินทรีย์กระจายไปทั่วระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก แต่ความแตกต่างในทางสัณฐานวิทยา กลไกการทำงาน การเผาผลาญ และสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังมีความหนาแน่นของแบคทีเรียที่ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามทางเดินอาหารจาก 10^5 เซลล์แบคทีเรีย/กรัมของสารที่บรรจุใน luminal ในลำไส้เล็กส่วนต้นที่ 10^7 - 10^{12} เซลล์แบคทีเรีย/กรัมของของสารที่บรรจุใน luminal ใน ileum ไปยังลำไส้ใหญ่ ดังแสดงในภาพที่ 1 (Yadav, S. and Jha, R. 2019)

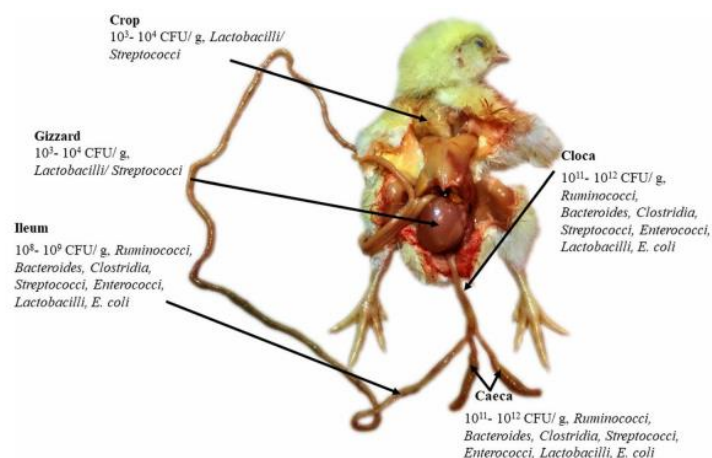


Figure 1 The major bacterial habitats and concentration in the gastrointestinal tract of chicken (Crop, Gizzard, Ileum, Caeca, Cloca)

Source: Yadav, S., & Jha, R., 2019

Table 1 Spatial distribution of most common and abundant bacterial taxa (phylum, order (o), family (f), genus (g) in the gastro-intestinal tract of chickens irrespective of age, diet and technique differences

GIT location (per g of content)	Bacterial phyla	Bacteria/genera	Techniques used
Crop (10^8 - 10^9 /g)	Firmicutes	<i>Lactobacillus</i>	16S rDNA
	Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>	sequencing and
	Proteobacteria	<i>Enterobacter</i>	cloning
Gizzard (10^7 - 10^8 /g)	Firmicutes	<i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i>	
Small Intestine (most of the studies are conducted in Ileum; 10^8 - 10^9 /g)	Firmicutes/Low G+C, Gram positive bacteria	Enterococcaceae (f.), <i>Enterococcus</i> , Clostridiaceae (f.), Clostridium, Lactobacillaceae (f.) Lactobacillus,	Finger printing: T-RFLP, 16S rRNA qPCR, Cloning and sequencing and Next Generation Sequencing

GIT location (per g of content)	Bacterial phyla	Bacteria/genera	Techniques used
		Candidatus Arthomitus, Weisella, Ruminococcus, Eubacterium, Bacillus, Stapylococcaceae (f.), Staphylococcus Cytophaga/ Flexibacter/ Bacteroides/ High G+C, Gram positive bacteria Bacteroidaceae (f.), Bacteroidetes, Flavibacterium, Fusobacterium, Bifidobacterium	
	Protobacteria Actinobacteria/ Cyanobacteria	Alcaligenes, Escherichia, Campylobacter, Hafnia, Shigella, Corynebacterium	
Caeca (10^{10} - 10^{11} / g)	Methanogenic Archaea (0.81%)	Methanobrevibacter, Methanobacterium, Methanothermobacter , Methanosphaera, Methanopyrus, Methanothermus, Methanococc	Finger printing: T-RFLP, 16S rRNA qPCR, Cloning and sequencing and Next Generation Sequencing

GIT location (per g of content)	Bacterial phyla	Bacteria/genera	Techniques used
	Firmicutes/ Low G+C, Gram positive bacteria (44–56%)	Anaerotruncus, Ruminococcaceae (f) Ruminococcus, Faecalibacterium, Lachnospiraceae, Bacillus, Streptococcus, Clostridiales(o), Clostridium, Megamonas, Lactobacillus, Enterococcus, Weisella, Eubacterium, Staphylococcus, Streptococcus, Bacteroides/ Cytophaga/ Flexibacter/ High G+C, Gram positive bacteria (23–46%) Actinobacteria Proteobacteria (1–16%)	
	Bacteroides/	Rikenellaceae(f),	
	Cytophaga/	Bacteroidetes, Alistipes,	
	Flexibacter/	Fusobacterium,	
	High G+C, Gram positive bacteria (23–46%)	Bifidobacterium, Flavibacterium, Odoribacter,	
	Actinobacteria	Corynebacterium	
	Proteobacteria (1–16%)	Ochrobacterium, Alcaligenes, Escherichia, Campylobacter	

GIT location (per g of content)	Bacterial phyla	Bacteria/genera	Techniques used
Large Intestine	Firmicutes	Lactobacillus	16 S rDNA
	Proteobacteria	Escherichia	sequencing and cloning

Source: Adapted from Shang et al., 2018

การเสริมโพรไบโอติกในอาหารสัตว์

โพรไบโอติก ถูกนำมาใช้ครั้งแรกโดย Lilly and Stillwell (1965) จากนั้น Parker (1974) ได้นิยามโพรไบโอติกว่าเป็น “สารจากสิ่งมีชีวิตที่นำไปสู่ความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้” จึงรวมทั้งสารจากสิ่งมีชีวิตและสารที่ไม่มีชีวิต Fuller (1989) นิยามโพรไบโอติกว่า “เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากจุลินทรีย์มีชีวิตซึ่งมีประโยชน์ต่อสัตว์เจ้าบ้าน (host) โดยการปรับปรุงความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยในปัจจุบัน Food and Agriculture Organization of United Nation (FAO) ได้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกว่า “จุลินทรีย์โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตที่มีประโยชน์ เมื่อรับประทานในปริมาณที่เหมาะสมจะให้คุณประโยชน์ต่อร่างกาย โดยจะเข้าไปช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารด้วยการลดการเกาะติดของจุลินทรีย์ก่อโรค เป็นการเพิ่มสัดส่วนของจุลินทรีย์ที่ดีในทางเดินอาหารจึงช่วยให้ระบบการย่อยและการดูดซึมอาหารมีความสมดุลในลำไส้ และช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันทำให้มีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคได้ดียิ่งขึ้น” (Hill et al., 2014; FAO, 2016) การเสริมโพรไบโอติกในอาหารสัตว์จึงมีแนวโน้มที่จะทำให้เกิดประสิทธิภาพในการเลี้ยงที่ดี ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตของสัตว์เพิ่มขึ้น และทำให้สัตว์มีสุขภาพที่ดี โพรไบโอติกจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้เพื่อทดแทนการใช้ยาและสารปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ได้

Bacillus subtilis สามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อนได้สูง และทนสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะของสัตว์ปีกได้ อีกทั้งยังเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติสร้างเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีน และสร้างเอนไซม์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่ดีจะยึดพื้นที่ในผนังลำไส้ของสัตว์เพื่อลดแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Salmonella* เป็นต้น ซึ่งชนิดของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย ที่อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* เป็นต้น (Table 2)

Table 2 Probiotics studied for application in animal feed

Genus	Species
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i> (<i>B. animalis</i>)
	<i>B. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (<i>B. lactis</i>)
	<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i> (<i>B. longum</i>)
	<i>B. pseudolongum</i> subsp. <i>pseudolongum</i> (<i>B. pseudolongum</i>)
	<i>B. thermophilum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> (<i>Streptococcus faecalis</i>)
	<i>E. faecium</i> (<i>Streptococcus faecium</i>)
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i>
	<i>L. amylovorus</i>
	<i>L. brevis</i>
	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> (<i>L. casei</i>)
	<i>L. crispatus</i>
	<i>L. farmicinis</i>
	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. murinus</i>
	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> (<i>L. plantarum</i>)
	<i>L. amylovorus</i> (<i>L. sobrius</i>)
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (<i>Streptococcus cremoris</i>)
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. citreum</i>
	<i>L. lactis</i>
	<i>L. mesenteroides</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i>
	<i>P. pentosaceus</i> subsp. <i>pentosaceus</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. freudenreichii</i>
	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i> (<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>)

Genus	Species
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> (<i>B. cereus</i> var. <i>toyoi</i>)
	<i>B. licheniformis</i>
	<i>B. subtilis</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i> (<i>S. boulardii</i>)
	<i>S. pastorianus</i> (<i>S. carlsbergensis</i>)
<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. fragilis</i>
	<i>K. marxianus</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>A. oryzae</i>
	<i>A. niger</i>

Source: Gaggia et al., 2010

Chen et al. (2018) ได้ศึกษาผลของการเสริมซินไบโอติก คือ พร็อบิโอติก พรุกโต-โโอลิแซ็กคาไรด์ และส่วนผสมของโพรไบโอติกของจุลินทรีย์ 4 สายพันธุ์ (*Bifidobacterium animalis*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* และ *Lactobacillus reuteri*) ใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ลักษณะซาก คุณภาพเนื้อ และระบบภูมิคุ้มกันในเป็ดเนื้อสายพันธุ์เซอร์รี่ วอลเลย์ โดยการทดลองแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่มีการเสริมยาปฏิชีวนะ zine bacitracin ในอาหาร 40 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และกลุ่มที่เสริมซินไบโอติกในอาหาร 1.5 กรัม/กิโลกรัม พบว่าเป็ดที่ได้รับการเสริมซินไบโอติกในอาหารมีน้ำหนักไขมันในช่องท้องต่ำกว่ากลุ่มอื่น ๆ รวมทั้งระบบภูมิคุ้มกันในลำไส้เล็กส่วนปลาย ทำให้ค่า T-SOD (total superoxide dismutase) เพิ่มขึ้น ซึ่งค่า T-SOD เป็นโปรตีนที่มีโลหะเป็นตัวกระตุ้นให้กำจัดอนุมูลอิสระ และปริมาณของมาลอนไดอัลดีไฮด์ใช้เป็นตัวชี้วัดถึงระดับการถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุของโรคต่าง ๆ พบว่ากลุ่มที่เสริมด้วยซินไบโอติกทำให้ค่าของมาลอนไดอัลดีไฮด์ลดลง ดังนั้น การเสริมซินไบโอติกมีแนวโน้มที่จะสามารถใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะได้

ผลของจุลินทรีย์ต่อการดูดซึมสารอาหารในทางเดินอาหารสัตว์ปีก

การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยและการดูดซึมสารอาหารสัตว์เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเกิดการปรับสภาพภายในลำไส้ของสัตว์ ทำให้ลำไส้มีความเป็นกรด โดยการ

ผลิตภัณฑ์อินทรีย์ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ด้วยการแย่งยึดเกาะกับเยื่อทางเดินอาหาร และมีการเพิ่มจำนวนบนเยื่อผนังลำไส้ทุกส่วนโดยแทรกตัวระหว่างวิลไล

จากการรายงานของ Li *et al.* (2019) ได้ศึกษาสัณฐานวิทยาของลำไส้ของไก่เนื่องจากการเสริมโพรไบโอติก *Bacillus* spp. โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง ประกอบด้วยอาหารกลุ่มควบคุม *Bacillus coagulans* TBC169, *B. subtilis* และ *B. subtilis* DSM32315 จากการศึกษาพบว่าอาหารที่มีการเสริม *Bacillus coagulans* TBC169 ทำให้สัดส่วนความสูงวิลไลต่อความลึกของคริปต์ในลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนกลางเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารกลุ่มควบคุม

Guo *et al.* (2016) ได้ศึกษาผลของ *B. subtilis* ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในเป็ด Cherry valley โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มอาหารควบคุม และอาหารควบคุมที่มีการเสริมด้วย *B. subtilis* 1×10^6 โคโลนีต่อกิโลกรัม (CFU/kg) อาหาร พบว่ากลุ่มที่มีการเสริมด้วย *B. subtilis* ลำไส้เล็กส่วนต้น (Duodenum) และลำไส้ส่วนกลาง (Jejunum) ทำให้ความสูงวิลไล และสัดส่วนความสูงวิลไลต่อความลึกของคริปต์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอาหารควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 3

จากการศึกษาของ ศศิ วิมล (2557) ได้ศึกษาผลของการเสริมสารเสริมชีวนะ (*Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis*) ต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโต การย่อยได้ของสารอาหาร จำนวนจุลชีพในไส้ตัน และสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กในไก่เนื้อ อาหารที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 4 สูตร คือ 1) อาหารควบคุม 2) อาหารควบคุมเสริมด้วยยาปฏิชีวนะ Amoxycillin 200 พีพีเอ็ม (ppm) 3) อาหารควบคุมเสริมด้วย *B. subtilis* และ *Bacillus licheniformis* 2.5×10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัม (CFU/kg) อาหาร และ 4) อาหารควบคุมเสริมด้วย *B. subtilis* และ *B. licheniformis* 5×10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัม (CFU/kg) อาหาร ทำการเก็บลำไส้เล็กส่วนกลางเพื่อวัดค่าสัณฐานวิทยา โดยทำการเก็บข้อมูลรวมทั้งหมด 2 ช่วงเวลา ได้แก่ ช่วงวันที่ 21 และ 42 ของการทดลอง ผลค่าสัณฐานวิทยาในลำไส้ พบว่าในวันที่ 21 และ 42 ของการทดลองสารเสริมชีวนะ *Bacillus subtilis* และ *B. licheniformis* ทั้งสองระดับมีความสูงของวิลไลเพิ่มขึ้น นอกจากนี้อัตราส่วนของวิลไลต่อคริปต์ในกลุ่มที่เสริม *B. subtilis* และ *B. licheniformis* ที่ระดับ 5×10^7 โคโลนีต่อกิโลกรัม (CFU/kg) อาหารดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Table 3 Effects of supplementing the diets offered to ducks with *Bacillus subtilis* on small intestinal morphology (28 d)

Item	Control	<i>B. subtilis</i> 1 x 10 ⁶ CFU/g
Duodenum		
Villus height (µm)	902.95 ± 45.49 ^a	945.39 ± 26.51 ^b
Crypt depth (µm)	213.32 ± 26.09 ^b	176.39 ± 16.43 ^a
VH/CD	4.29 ± 0.57 ^a	5.40 ± 0.61 ^b
Jejunum		
Villus height (µm)	594.65 ± 33.84 ^a	689.02 ± 46.32 ^b
Crypt depth (µm)	200.22 ± 24.57	180.83 ± 35.90
VH/CD	3.00 ± 0.33 ^a	3.92 ± 0.74 ^b
Ileum		
Villus height (µm)	426.40 ± 18.00	438.64 ± 27.38
Crypt depth (µm)	129.20 ± 17.89	147.91 ± 30.64
VH/CD	3.36 ± 0.49	3.08 ± 0.66

Data were expressed as means ± standard deviations of three replicates (n = 5) per treatment.

^{a, b} Values with different superscripts in the same row differ significantly ($P < 0.05$).

Differences were detected with Student's t test.

Source: Guo et al., 2016

ความรู้พื้นฐานของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ปีกช่วยให้เกิดความเข้าใจในกระบวนการเกิดโรคและการตอบสนองต่อการทำวัคซีน ซึ่งปฏิกิริยาระบบภูมิคุ้มกันของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกอาจเกิดจากความสามารถในการกระตุ้นการผลิตไซโตไคน์ ซึ่งนำไปสู่การควบคุมภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity) เป็นระบบการป้องกันพื้นฐานของร่างกาย เพื่อต่อสู้ต่อการติดเชื้อ ซึ่งประกอบด้วยแนวป้องกันทางกายภาพและเคมี เช่น ผิวหนัง เยื่อเมือกและน้ำย่อยในกระเพาะ ซึ่งช่วยป้องกันการบุกรุกของตัวก่อโรค โปรตีนในเลือด

เซลล์ฟาโกไซต์ (phagocytic cell) และคอมพลีเมนต์ (complement) ซึ่งเป็นกลุ่มของโปรตีนในซีรัม ซึ่งจะทำงานร่วมกับแอนติบอดีในการทำลายเซลล์เป้าหมาย พบว่าเซลล์เม็ดเลือดหลายชนิดทำหน้าที่ในการฟาโกไซต์ คือ การกลืนกินและทำลายตัวก่อโรค โดยเซลล์เหล่านี้ ได้แก่ มาโครฟาจ (macrophage) เซตเทอโรฟิล (heterophil) ธรอมโบไซต์ (thrombocyte) และ natural killer cells ภูมิคุ้มกันไม่จำเพาะถือเป็นปราการด่านแรกในการป้องกันการติดเชื้อ แต่ภูมิคุ้มกันไม่จำเพาะนี้ขาดความจำเพาะในการต่อสู้กับตัวก่อโรคชนิดต่าง ๆ ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะจะทำงานเมื่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะไม่สามารถหยุดยั้งตัวก่อโรคที่บุกรุกเข้าร่างกายสัตว์ได้ ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะจะจดจำเป้าหมายที่มีลักษณะโมเลกุลที่จำเพาะบนผิวของตัวก่อโรคเป็นผลให้เกิด กระบวนการในการกำจัดตัวก่อโรคและสามารถป้องกันโรคได้เมื่อมีการติดเชื้อซ้ำ การป้องกันที่จำเพาะสามารถเกิดขึ้นได้โดยภูมิคุ้มกันที่ได้รับมา (passive immunity) หรือภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นเอง (active immunity) ภูมิคุ้มกันที่ได้รับมา ได้แก่ แอนติบอดีจากแม่ที่พบได้ในลูกไก่แรกฟัก ซึ่งสามารถป้องกันตัวก่อโรคชนิดต่าง ๆ ที่แม่ไก่ได้รับการสัมผัสเชื้อโรคหรือจากการทำวัคซีน ส่วนภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้นเอง คือ ภูมิคุ้มกันที่สัตว์ปีกพัฒนาขึ้นเมื่อสัมผัสกับตัวก่อโรค สามารถพบได้ใน *Lactobacillus* ที่สามารถกระตุ้นการสร้างแกมมาโกลบูลิน (gamma globulin) แกมมาอินเตอร์เฟอรอน (gamma interferon) และส่งเสริมกิจกรรมของแมคโครฟาจ (macrophage) ซึ่งเป็นสาเหตุของการกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกาย (อัจฉรา, 2550) โพรไบโอติกมีอิทธิพลต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โดยไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่อยู่ในเนื้อเยื่อน้ำเหลืองบริเวณลำไส้ เนื้อเยื่อน้ำเหลืองนี้แพร่กระจายอยู่ระหว่างชั้นของเซลล์เยื่อบุผิว และถัดมาจนเกือบถึงเซลล์กล้ามเนื้อ โพรไบโอติกสามารถกระตุ้นเนื้อเยื่อน้ำเหลืองบริเวณลำไส้ โดยตัวโพรไบโอติก หรือชิ้นส่วนของโพรไบโอติก หรือสารเมตาบอไลต์ที่โพรไบโอติกสร้างขึ้น เรียกว่า แอนติเจน เมื่อแอนติเจนเข้าไปในลำไส้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุผิว เป็น M-cells ที่สามารถจับแอนติเจน เซลล์เยื่อบุผิวที่ตายแล้ว (apoptosis) หรือแบคทีเรียจากช่องว่างในลำไส้ แล้วส่งเข้าไปยัง sub-epithelial dome ของ Peyer's patches เพื่อให้ถูกทำลายไปโดยแมคโครฟาจ (ธัญรดา, 2553) ซึ่งเส้นผ่านศูนย์กลางของ Peyer's patches ในลำไส้เล็กส่วนปลาย น้ำหนักเบอร์ซา (bursa) และม้าม (spleen) สามารถบ่งบอกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในไก่อายุ 35 วัน หลังการเสริมโพรไบโอติกได้ (Harimurti, S and Hadisaputro, W. 2015)

การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ปีก

1. Interferon Type I

อินเตอร์เฟอรอน (Interferon หรือ IFN) เป็น cytokine ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ทนต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัสได้ ชนิดของอินเตอร์เฟอรอนสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด ตามคุณสมบัติทางเคมี เซลล์ที่สร้าง และตามลักษณะของแอนติเจนที่กระตุ้นให้เกิดการสร้าง IFN คือ alpha (α), beta (β) และ gamma (γ) โดยที่ IFN- α จะถูกสร้างขึ้นจาก leukocytes ส่วน IFN- β ถูกสร้างจาก fibroblasts ซึ่งอินเตอร์เฟอรอนทั้ง 2 ชนิดนี้จะจับกับ IFN receptor ชนิดเดียวกันมีความสำคัญในระบบ innate immunity โดยเป็นกลไกแรก ๆ ที่จะช่วยทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสจัดว่าเป็น type 1 interferon ส่วน IFN- γ ถูกสร้างจาก activated T lymphocytes ถูกจัดเป็น type 2 interferon การสร้าง IFN- γ จะต้องมีการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนก่อน IFN- γ เป็นปัจจัยควบคุมภูมิคุ้มกันที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งในสัตว์ปีก เมื่อเชื้อโรคเข้าสู่เซลล์ที่จับกินจะถูกย่อยสลายเป็นโปรตีนสายสั้น ๆ ที่เรียกว่า เปปไทด์ (antigen processing) และนำเสนอให้กับ T cell ผ่านทาง major histocompatibility complex (MHC) class I หรือ II ขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจน และแสดงฤทธิ์ต้านไวรัสในวงกว้าง เสริมสร้างภูมิคุ้มกันของเซลล์และร่างกาย (Crow C.A.2003)

นอกจากนี้มีการศึกษาของ Jennifer et al. (2010) ได้ศึกษาผลของ Lactobacilli ต่อการแสดงออกของ cytokine ของม้ามและต่อมทอนซิลในไก่สายพันธุ์ทางการค้า พบว่าในม้ามและต่อมทอนซิล mononuclear cells มีการแสดงออกของ *IL-12 β* และ *IFN- γ* เพิ่มขึ้นหลังจากที่ได้รับ *Lactobacillus* ที่ 3, 6, 12, 18 ชั่วโมง และชนิด *L. acidophilus* มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นขึ้นในการเหนี่ยวนำ T-helper-1 cytokines ขณะที่ชนิด *L. salivarius* ทำให้เกิดการตอบสนองจากการอักเสบ

Sato et al. (2009) ได้ศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์ของ immunobiotics ที่เกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่อในต่อมน้ำเหลืองภายในลำไส้ของลูกไก่แรกเกิด จากการศึกษาพบว่า ลูกไก่กลุ่มที่ได้รับอาหารเสริม immunobiotics ทุกกลุ่มทดลอง มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน interleukin-2 (IL-2) และ interferon- γ (IFN- γ) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า immunobiotics อาจเป็นประโยชน์สำหรับเป็นตัวสร้างภูมิคุ้มกัน เพื่อกระตุ้นการทำงานของระบบทางเดินอาหาร และระบบภูมิคุ้มกันในลูกไก่แรกเกิดได้

2. Interleukin 6

Interleukin-6 (IL-6) เป็นหนึ่งในไซโตไคน์ในการต่อสู้กับเชื้อโรค และกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ (inflammatory cytokines) ที่สำคัญโดยทำหน้าที่ชักนำก่อให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบเฉียบพลัน IL-6 สร้างได้จากเซลล์หลายชนิด ได้แก่ fibroblast, stromal cell,

macrophage, T lymphocyte และ mast cell เป็นต้น หน้าที่หลักของไซโตไคน์นี้คือชักนำเซลล์ต่าง ๆ ให้มีการสร้าง acute phase protein ซึ่งมีบทบาทในการสร้างเม็ดเลือดหลายชนิดและช่วยกระตุ้น เซลล์ B lymphocyte

จากรายงานของ Jennifer et al. (2007) ได้ศึกษาผลของสายพันธุ์ไก่ต่อการแสดงออกของ cytokine mRNA ในม้ามและไส้ติ่ง ไก่สายพันธุ์ทางการค้า 3 สายพันธุ์ คือ Broiler, Fayoumi และ Leghorn หลังจากได้รับเชื้อของ *Salmonella enteritidis* เก็บตัวอย่างจากม้ามและไส้ติ่ง เพื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันทั้งหมด 11 ยีน คือ ยีน BAK, Bcl-x, *IL-1b*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-12 α* , *IL-12 β* , *IL-18*, *IFN-g*, *CCLi2* และ *CXCLi2* พบว่า สายพันธุ์ของไก่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *CXCLi2*, *IL-10*, *IL-12 α* , and *CCLi2* mRNA ในม้าม และการแสดงออกของยีน *IL-12 α* , *IL-12 β* , *IL-18* และ *CCLi2* mRNA ในไส้ติ่ง ซึ่งสายพันธุ์มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของ cytokine mRNA ในไก่และอาจเป็นไปได้ว่าความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์มีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันบางอย่างได้

3. Interleukin 10

Interleukin-10 (IL-10) เป็นไซโตไคน์ด้านการอักเสบที่ควบคุมแบบกำเนิดด้วยการตอบสนองต่อการอักเสบในระหว่างการติดเชื้อไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา โปรโตซัว และพยาธิ (Couper et al., 2008; Moore et al., 2001) และมีบทบาทสำคัญในภูมิคุ้มกันของลำไส้และสภาวะสมดุล ในปัจจุบัน IL-10 ได้รับการยอมรับว่าเป็นไซโตไคน์ที่มีหน้าที่ที่หลากหลาย โดยการผลิตเซลล์ภูมิคุ้มกันหลายชนิด ได้แก่ macrophages, monocytes, dendritic cells (DCs), TH1, TH2, TH17 และควบคุมการทำงานของ T-cell และ B-cell (Couper et al., 2008; Moore et al., 2001; Saraiva and O'Garra, 2010) โดย IL-10 จะเริ่มทำงานหลังจากการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่ทำให้เกิดการอักเสบต่อการติดเชื้อ ทำหน้าที่ใน macrophages และ dendritic cells (DCs) เพื่อยับยั้งการกระตุ้น macrophages และการผลิตไซโตไคน์ที่มีการอักเสบ เช่น interferon- γ , tumor necrosis factor α , IL-1 β , IL-2 และ IL-6 (Scheller et al., 2011; Arendt et al., 2016)

Rothwell et al. (2004) ได้รายงานว่า การแสดงออกของ *IL-10* mRNA หลัก ๆ ส่วนใหญ่เกิดขึ้นใน bursa ของ fabricius และ cecal tonsils ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไซโตไคน์ IL-10 มีบทบาทในการปรับภูมิคุ้มกันในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Murphy and Reiner, 2002) นอกจากนี้ Lee et al. (2018) ได้ศึกษาการผลิต IL-10 ของไก่ในเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้ (intestinal epithelial cells; IECs) ถูก

กระตุ้นด้วย *Clostridium perfringens* หรือโรคอาหารเป็นพิษ พบว่าการผลิต IL-10 เพิ่มขึ้นใน IECs ของไก่ที่หลังจากมีการติดเชื้อ *Clostridium perfringens*

4. Toll like receptor 3

Toll-like receptors (TLRs) เป็นตัวรับชนิด type I จัดอยู่ในกลุ่มของ pattern-recognition receptors (PRRs) ที่มีความสำคัญต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด เพื่อตอบสนองต่อเชื้อโรคที่บุกรุกผ่านการจดจำรูปแบบ ซึ่งภูมิคุ้มกันระบบนี้จะจับกับชิ้นส่วนที่มีลักษณะเหมือน ๆ กันในกลุ่มเชื้อก่อโรคที่เรียกว่า pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) (Takeda et al., 2003) การรับรู้โมเลกุลของเชื้อไวรัสด้วย PRRs จะส่งผลให้เกิดการหลั่งสารทางชีวภาพหลายอย่าง รวมถึงไซโตไคน์ชนิดต่าง ๆ เพื่อใช้ในกลไกการต่อสู้กับเชื้อไวรัสที่แตกต่างกัน โดยเมื่อเกิดการจับกันของเชื้อจุลชีพกับ TLRs แล้ว จะเกิดการส่งสัญญาณต่าง ๆ เข้าไปในเซลล์ (TLR signaling) โดยสัญญาณที่เกิดขึ้นที่สำคัญมี 2 สัญญาณด้วยกัน คือ

1. MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) ซึ่งสัญญาณส่วนใหญ่จะทำให้เกิดการกระตุ้นผ่าน NF- κ B และทำให้เกิดการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory gene) ต่าง ๆ ตามมา

2. TRIF (TIR domain containing adapter inducing interferon- β) ซึ่ง จะ ส่งสัญญาณผ่าน IRFs (interferon regulatory factors) ซึ่งจะก่อให้เกิดการกระตุ้นและสร้าง type I IFN คือ IFN- α และ IFN- β เพื่อต่อต้านเชื้อไวรัส

3. TLR3 ทำหน้าที่จดจำ double-stranded RNA (dsRNA) จากไวรัส ซึ่งในเป็ดมีความคล้ายหรือใกล้เคียงกับนกชนิดอื่น ๆ มาก คิดเป็นร้อยละ 83.42 – 91.50 โดยเฉพาะในห่านคิดเป็นร้อยละ 91.50 และในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมยีน TLR3 มีความใกล้เคียงปานกลาง ร้อยละ 56.64 – 58.98 ส่วนในปลา มีเพียงแค่ ร้อยละ 45 (Gu et al., 2020) จากรายงานของ Jiao et al. (2012) พบว่าเป็ดที่มีสุขภาพดี พบว่าการแสดงออกของยีน TLR3 ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่หลากหลาย โดยมีระดับการแสดงออกสูงสุดในตับ ไต รังไข่ และกล้ามเนื้ออก ในเป็ดสายพันธุ์ Muscovy ตรวจพบว่าระดับการแสดงออกของยีน TLR3 สูงสุดในหลอดลม ต่อมตับอ่อน ม้าม ลำไส้เล็กส่วนต้น และปอด ส่วนสมอง หัวใจ และผิวหนังมีระดับการแสดงออกของยีนที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งลักษณะทางชีววิทยาและบทบาท TLR3 ของเป็ดในกระบวนการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์นั้นยังมีความรู้ความเข้าใจอยู่น้อยมาก (Zhang et

al., 2015) ทั้งนี้ การแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับอายุของสัตว์ สายพันธุ์ การสัมผัสกับตัวอย่างของตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกัน

5. Myxovirus resistance

โปรตีน Myxovirus resistance (Mx) มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดต่อการติดเชื้อไวรัส และผลิตมาจากหลากหลายเซลล์ เช่น hepatocytes, endothelial cells, and immune cells (Fernandez, et al. 1999) พบได้ในสัตว์หลากหลายชนิดตั้งแต่ปลาไปจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และได้รับการพิสูจน์แล้วว่าให้ความต้านทานต่อไวรัสทั้ง DNA และ RNA ที่หลากหลาย (Haller, et al. 2007)

การศึกษาประชากรจุลินทรีย์ทั้งหมดในทางเดินอาหารสัตว์ปีก ด้วยเทคนิค Microbiome analysis

การตรวจสอบความหลากหลายของแบคทีเรียจากสิ่งแวดล้อมธรรมชาติ โดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture dependent method) เป็นวิธีที่ใช้เวลานาน ค่าใช้จ่าย และแรงงานมาก นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และยังมีข้อจำกัดหลายประการ ได้แก่ อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ไม่สามารถจำลองสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ในธรรมชาติได้จริง เช่น pH แล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโตได้จริงทั้งหมด ในช่วง 10-20 ปีที่ผ่านมา การวิเคราะห์ในระดับอนุชีววิทยา (molecular biology หรือ culture-independent method) ได้เข้ามามีบทบาทอย่างมาก เนื่องจากสามารถสกัดดีเอ็นเอ ออกมาได้โดยตรงจากตัวอย่างที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อมทุกประเภท (Zhengdong et al., 2002) และปัจจุบันวิธีเปรียบเทียบด้วยการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) เป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้อย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีให้ข้อมูลความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ในการวัดการสืบทอดทางพันธุกรรมร่วมกัน โดย Ribosomal RNA gene ถูกเลือกนำมาศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตอย่างแพร่หลาย เช่น 16s หรือ 18s เนื่องจากความยาวของ reads ที่ได้ค่อนข้างยาว ทำให้การจัดเรียงและเชื่อมต่อลำดับเบสสามารถทำได้อย่างสมบูรณ์ และการประกอบเรียงขึ้นลำดับเบสสามารถครอบคลุมส่วนของยีนที่ทราบและไม่ทราบได้ นอกจากนี้ ได้มีการพัฒนาขั้นตอนการทดลองการเตรียม library ใหม่ และพัฒนาระบบการวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์ให้มีความสามารถในการสร้าง reads ที่ยาวขึ้นได้ (Rodrigue et al., 2010) ซึ่งการจำแนกไมโครไบโอมิตาทางเดินอาหารด้วยเทคโนโลยี Next-generation sequencing (NGS) โดยไม่ต้องทำการ culture-independent เช่น การตรวจหาหัส

พันธุกรรมของยีนที่กำหนดการสร้าง 16s RNA พบว่าร้อยละ 90 ของไมโครไบโอตาในทางเดินอาหาร พบเชื้อแบคทีเรีย 2 ไฟลัมหลัก ได้แก่ Firmicutes และ Bacteroidetes ตามด้วย Actinobacteria และ Proteobacteria ซึ่งแบคทีเรียในไฟลัม Bacteroidetes และ Proteobacteria จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบมีความสามารถในการย่อยคาร์โบไฮเดรต และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยคาร์โบไฮเดรต จะช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และช่วยป้องกันการรุกรานของเชื้อโรค ส่วนแบคทีเรียในไฟลัม Firmicutes มีผนังเซลล์แบบแกรมบวก เช่น Bacillales, Lactobacillales และ Clostridiales ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตเชิงเดี่ยว

แบคทีเรียในลำไส้จะมีบทบาทสำคัญต่อสุขภาพของสัตว์ โดยมีผลต่อรูปลักษณะของท่อนำทางเดินอาหาร โภชนะ การเกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร และภูมิคุ้มกันโรค จุลินทรีย์ในลำไส้จะช่วยป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ที่ก่อโรคมายึดเกาะผนังลำไส้ และยังช่วยตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันโรคของร่างกาย (Mead, 2000) อย่างไรก็ตามมีปัจจัยหลายประการ ที่ส่งผลกระทบต่อส่วนประกอบของแบคทีเรียในลำไส้สัตว์ปีก เช่น อาหาร อายุของสัตว์ปีก การให้ยาปฏิชีวนะ และการติดเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค

จากการศึกษาของ Even, M *et al.* (2018) ได้ศึกษาผลของการเสริมโพรไบโอติก (*Lactobacillus salivarius*) ในเป็ดสายพันธุ์ mule ด้วยการวิเคราะห์ในระดับชีวโมเลกุลโดยการใช้ยีน 16S rRNA พบว่าเป็ดที่อายุ 14 วัน ใน ileal และ cecal จะพบ Firmicutes (ในตระกูล Clostridiales) อย่างไรก็ตามการเสริมด้วยโพรไบโอติกมีผลต่อการแสดงออกของยีนและความหลากหลายของแบคทีเรียเพียงเล็กน้อย

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. Autoclave (ES-315) \ TOMY, Japan
2. Balances Analytical (BSA323S) \ Sartorius, Switzerland
3. Centifuge (WiseSpin CF-10) \ Wisd, Korea
4. CFX Connect Real-Time PCR Detection System \ Bio-rad, USA
5. Colibri Microvolume Spectrometer \ Nanodrop, Germany
6. Electrophoresis system (The PowerPac™) HV power supply \ Bio-rad, USA
7. Eppendorf tubes rack \ Lab connection, Thailand
8. Gel Documentation (Vilber Lourmat) \ Lio lab international, Thailand
9. Gloves \ Sri Trang Agro-Industry, Thailand
10. Hinged Microcentrifuge Tube Freezer Racks \ Lab connection, Thailand
11. Incubator (WiseThermHB-48P) \ Wisd, Korea
12. Individual PCR Tubes 8-strip, clear \ Bio-rad, USA
13. Micropipette (0.1 - 2.5 μ l) \ SCILOGEX, USA
14. Micropipettes (0.5 - 10 μ l) \ SCILOGEX, USA
15. Micropipettes (2 - 20 μ l) \ SCILOGEX, USA
16. Micropipette (20 - 200 μ l) \ SCILOGEX, USA
17. Micropipette (100 - 1000 μ l) \ SCILOGEX, USA
18. Microwave oven \ Napatinter, Thailand
19. MiniScan EZ User's Manual version 1.2 \ USA
20. MPW Laboratory Centrifuge M-UNIVERSAL \ Med. Instruments, Poland
21. NANO-300 Micro Spectrophotometer \ HINOTEK instruments, China
22. Optical flat 8-cap strips for 0.2ml. tube strips \ Bio-rad, USA
23. PCR tube \ Lab connection, Thailand
24. Meat pH meter \ HANNA instruments, Romania
25. Tips pipette \ Lab connection, Thailand

26. Thermocouple thermometer DTM 315 \ Tecpel Co., Ltd. China
27. PCR Machine (T100™ Thermal Cycle) \ Bio-rad, USA
28. Spectrophotometer \ NanoDrop 2000 Thermo Science, USA
29. Vertex (CF-10) \ Wisd, Korea
30. Water bath \ Wisecircu, Daihan, Korea
31. 1.5 ml SNAPLOCK Microcentrifuge \ Lab connection, Thailand
32. 2" Cardboard Cryovial Box with Dividers \ Lab connection, Thailand

สารเคมีและเอนไซม์

1. Absolute Ethyl Alcohol \ RCI Labscan, Thailand
2. Agarose Powder \ Conda, Spain
3. Dream Tag Green PCR Master Mix (2X) Thermo Scientific, USA
4. Isopropanol \ RCI Labscan, Thailand
5. iTaq Universal SYBR® green supermix \ Bio-rad, USA
6. iScript Reverse Transcription supermix for RT-qPCR \ Bio-rad, USA
7. Loading dye \ Thermo Scientific, USA
8. MyTag™ HS Red Mix \ BioLine, United Kingdom
9. Nuclease-free Water \ Omega Bio-tek, Inc, USA
10. RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20,000x) \ iNtRON Biotechnology, Pacific Science, Thailand
11. RiboZol™ RNA \ VWR Life science, USA
12. RNA-Lock Reagent \ Omega Bio-tek, Inc, USA
13. Primer \ Integrated DNA Technologies, pacific science co. ltd, Thailand
14. Proteinase K \ US Biological, USA
15. QIAamp PowerFecal Pro DNA Kits \
16. Sodium Acetate \ Loba Chemie, India
17. TIANamp Stool DNA Kit \ TIANGEN Biotech (Beijing) Co.,Ltd., China
18. UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water \ Thermo Fisher Scientific, Inc., USA
19. 5x FIREPol® Master Mix Ready to Load \ Solis BioDyne, Estonia
20. 100 bp DNA Ladder \ Solis BioDyne, Estonia

สารละลาย

สารละลายทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เตรียมจากน้ำกลั่น Deionized & Demineralized (ddH₂O หรือ Millipore water) และการปรับ pH ทำโดยใช้ NaOH (conc.) (รายละเอียดการเตรียมสารแสดงในภาคผนวก)

1. Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7.4
2. TE Buffer
3. 1X TAE Buffer
4. 0.5 M EDTA pH 8.0
5. 3 M Sodium Acetate pH 5.2
6. 6 M Sodium Chloride
7. 5 M Sodium Chloride
8. 9% Sodium Chloride
9. 10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
10. 75% Ethanol
11. 80% Ethanol
12. Tris-Cl (1M)

การศึกษาปัจจัยด้านรูปแบบการเลี้ยงและพันธุกรรม

กรณีศึกษา: ผลของรูปแบบการเลี้ยงเปิดที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารในเปิด

การเก็บตัวอย่าง

ตรวจสอบความหลากหลายของแบคทีเรียจากรูปแบบการเลี้ยงเปิดของฟาร์มเกษตรกรท้องถิ่น ซึ่งเป็นโรงเรือนเปิด (conventional house/opened house) หมายถึง โรงเรือนที่มีสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ โดยจะแปรผันไปตามสภาพแวดล้อมภายนอกโรงเรือน และจากฟาร์ม การเลี้ยงเปิดทางการค้าเป็นโรงเรือนปิด (enclosed house/environmentally controlled house) หมายถึง โรงเรือนที่สามารถควบคุมสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น การระบายอากาศ แสงสว่าง ให้เหมาะสมกับความต้องการของเป็ด (ทั้งเป็ดเนื้อและเป็ดไข่) โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจากโรงเรือนเปิดและโรงเรือนปิด มาอย่างละ 5 ตัว รวมทั้งสิ้น 20 ตัว ดังแสดงในภาพที่ 2 เก็บ

ตัวอย่างใส่ตั้ง ใส่ tube 2.0 มิลลิลิตร เก็บไว้ในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) และ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าสกัด DNA ส่วนการเก็บตัวอย่างม้าม ใส่ใน tube 1.5 มิลลิลิตร ที่มี RNA later และแช่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาสกัด RNA ในขั้นตอนต่อไป

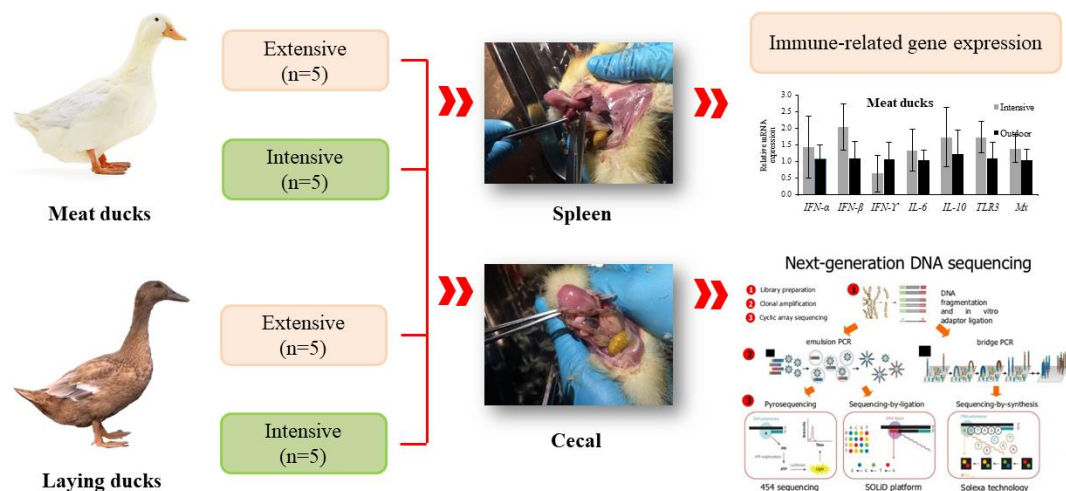


Figure 2 Flow diagram of the current research design. The ducks in MDEx, MDIn, LDEx, and LDIn groups were of two different breeds, as they were reared under different conditions.

การศึกษาปัจจัยด้านอาหาร

กรณีศึกษา: ผลของการเสริม *Bacillus toyonensis* BCT-7112^T ในเปิดต่อลักษณะประสิทธิภาพการผลิต ลักษณะซาก คุณภาพเนื้อ สันฐานวิทยาลัยการเกษตร การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และความหลากหลายของแบคทีเรียในทางเดินอาหาร

สัตว์ทดลองและการวางแผนการทดลอง

การทดลองทำโดยเลี้ยงเป็ดเนื้อสายพันธุ์บาร์บี้ (Barbary) เพศผู้ทั้งหมด 200 ตัว แบ่งออกเป็น 5 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว ลูกเป็ดทุกตัวถูกชั่งน้ำหนักและติดเบอร์ขาตั้งแต่อายุ 1 วัน การเลี้ยงการจัดการภายใต้สภาพแวดล้อมเดียวกัน ชั่งน้ำหนักเป็ดทุกตัวและเฉลี่ยน้ำหนักของเป็ดทุกตัวให้มีค่าใกล้เคียงกันมากที่สุด หลังจากนั้นแบ่งกลุ่มด้วยอาหารทดลองทั้งหมด 4 สูตร ได้แก่

สูตรที่ 1 อาหารควบคุมที่ไม่มีการเสริมโปรไบโอติกในอาหาร

สูตรที่ 2 อาหารควบคุมและเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 200 mg/kg

สูตรที่ 3 อาหารควบคุมและเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 mg/kg

สูตรที่ 4 อาหารควบคุมและเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 1000 mg/kg

ประกอบสูตรอาหารให้มีระดับพลังงานและโปรตีนที่ใช้ประโยชน์ได้ รวมทั้งวิตามิน และแร่ธาตุให้เพียงพอ (Table 4) โดยเทียบเคียงกับความต้องการของเป็ดเนื้อ โดยเป็ดได้รับน้ำและอาหารอย่างเต็มที่ (*ad libitum*) บันทึกน้ำหนักเป็ดเมื่อเริ่มต้นการทดลองและชั่งน้ำหนักเป็ดทุก ๆ สัปดาห์ จนถึงอายุ 8 สัปดาห์ ชั่งอาหารที่เหลือทุกสัปดาห์ เพื่อคำนวณน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน ปริมาณอาหารที่กิน และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวของเป็ดเนื้อที่ในแต่ละกลุ่มการทดลอง

Table 4 Ingredient composition and nutritive value of the basal diets for the experimental meat ducks.

Items	Starter (day 0 to 14)	Grower (day 15 to 35)	Finisher (day 36 to 56)
Ingredients			
Rice bran, full fat (12.14%)	20.00	30.00	40.00
Broken rice (6.81%)	44.49	36.51	34.58
Soybean meal 48.9% (47.2%)	23.42	18.89	13.36
DDGS (28.1%) ^a	5.00	-	-
Rice bran, SE 17.6%	1.31	6.52	3.10
Rice bran oil	0.48	2.98	4.00
Limestone	1.63	1.62	1.67
Biophos	1.51	1.57	1.59
Salt	0.43	0.36	0.30
Premix	0.25	0.25	0.25
Choline Chloride 50%	0.36	0.30	0.25
Pellet binder	0.30	0.30	0.30
L-Lysine HCL	0.28	0.20	0.18
DL-Methionine	0.22	0.18	0.14
L-Threonine	0.02	0.02	0.03
Mycofix plus	0.05	0.05	0.05
Prop impex	0.20	0.20	0.20

Items	Starter (day 0 to 14)	Grower (day 15 to 35)	Finisher (day 36 to 56)
Salinomycin 12%	0.05	0.05	-
Total	100	100	100
Calculated chemical composition ^b			
Dry matter (%)	88.80	89.22	89.55
Metabolizable energy (kcal/kg)	2800	2900	3000
Crude protein (%)	19.56	17.31	15.11
Crude fat (%)	4.57	8.09	10.36
Linoleic acid	1.51	2.53	3.21
Crude fiber (%)	4.54	5.59	6.08
Lysine (%)	1.18	1.03	0.87
Methionine + cysteine (%)	0.85	0.77	0.67
Calcium (%)	1.00	1.00	1.00
Phosphorus-total (%)	0.96	1.14	1.21
Phosphorus -avail (%)	0.50	0.50	0.50
Sodium (%)	0.20	0.16	0.14

^aDistillers Dried Grains with Solubles (DDGS).

^bThe nutrient values were calculated on the analyzed nutrient values according to NRC (1994).

การเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างของเหลวในไส้ติ่งปริมาณ 5 กรัม ใส่ tube 2.0 มิลลิลิตร เก็บไว้ในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) หรือที่อุณหภูมิต่ำกว่าจะสกัด DNA ส่วนการเก็บตัวอย่างม้าม ขนาด 0.5 มิลลิเมตร ใส่ใน tube 1.5 มิลลิลิตร ที่มี RNA later และแช่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าจะสกัด RNA และเก็บตัวอย่างลำไส้เล็กทั้ง 3 ส่วน ได้แก่ ลำไส้เล็กส่วนต้น (Duodenum) ลำไส้เล็กส่วนกลาง (Jejunum) และลำไส้เล็กส่วนปลาย (Ileum) รวมทั้งคุณภาพซากและคุณภาพเนื้อ ดังแสดงในตารางที่ 5

Table 5 Sample collections

Sample collection	1d	7d	14d	21d	28d	35d	42d	49d	56d
Body weight	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Feed intake	-	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ceca	-	-	✓	-	-	✓	-	-	✓
Spleen	-	-	✓	-	-	✓	-	-	✓
Intestine									
- Duodenum	-	-	✓	-	-	✓	-	-	✓
- Jejunum	-	-	✓	-	-	✓	-	-	✓
- Ileum	-	-	✓	-	-	✓	-	-	✓
Carcass traits	-	-	-	-	-	-	-	-	✓
Meat quality	-	-	-	-	-	-	-	-	✓

การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโต

บันทึกน้ำหนักเปิดเนื้อเมื่อเริ่มต้นการทดลองและชั่งน้ำหนักเปิดเนื้อทุก ๆ สัปดาห์ จนถึงอายุ 8 สัปดาห์ ทำการชั่งอาหารที่เหลือทุกสัปดาห์ เพื่อคำนวณน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน ปริมาณอาหารที่กิน และอัตราการการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวของเปิดเนื้อที่เลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่มีการเสริมโปรไบโอติกแตกต่างกัน จากสูตรที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

$$1) \text{ น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น} = \text{น้ำหนักตัวสุดท้าย (กรัม)} - \text{น้ำหนักตัวเริ่มต้น (กรัม)}$$

$$2) \text{ อัตราการเจริญเติบโต/ตัว/วัน} = \frac{\text{น้ำหนักตัวสุดท้าย (กรัม)} - \text{น้ำหนักตัวเริ่มต้น (กรัม)}}{\text{จำนวนวัน}}$$

$$3) \text{ ปริมาณอาหารที่กิน} = \text{ปริมาณอาหารที่ให้ (กรัม)} - \text{ปริมาณอาหารที่เหลือ (กรัม)}$$

$$4) \text{ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}$$

การศึกษาลักษณะซากและคุณภาพเนื้อ

1) การศึกษาลักษณะซาก

นำเปิดทั้งหมดเข้าการุณขนาดที่ 40 ตัว เพื่อศึกษาคุณภาพซาก โดยคำนวณหาร้อยละของซากอุ่น (Hot carcass percentage) ร้อยละของอวัยวะภายนอก (External organs percentage)

ร้อยละของอวัยวะภายใน (visceral organs percentage) ร้อยละของชิ้นส่วนตัดแต่ง (retail cuts percentage) จากสูตรที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ

- 1) ร้อยละของซากอ่อน = $\frac{\text{น้ำหนักซากอ่อน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักมีชีวิต (กรัม)}} \times 100$
- 2) ร้อยละของอวัยวะภายนอก = $\left[\frac{\text{น้ำหนักอวัยวะภายนอก (กรัม)}}{\text{น้ำหนักซากอ่อน (กรัม)}} \right] \times 100$
- 3) ร้อยละของอวัยวะภายใน = $\left[\frac{\text{น้ำหนักอวัยวะภายใน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักซากอ่อน (กรัม)}} \right] \times 100$
- 4) ร้อยละของชิ้นส่วนตัดแต่ง = $\left[\frac{\text{น้ำหนักชิ้นส่วนตัดแต่ง (กรัม)}}{\text{น้ำหนักซากอ่อน (กรัม)}} \right] \times 100$

หมายเหตุ: น้ำหนักซากอ่อน หมายถึง น้ำหนักซากที่เอาเครื่องในออก รวมทั้งหัวและแข้ง

2) การศึกษาคุณภาพเนื้อ

2.1) การวัดค่าความเป็นกรดและต่างของเนื้อ (muscle pH measurement)

ทำการวัดค่า pH ที่ชั่วโมงแรกที่สัตว์ตาย (ทำการจับเวลาที่ 45 นาทีหลังจากที่สัตว์ตาย : pH₄₅) และ pH สุดท้าย (ultimate pH : pH₂₄) วัดในชั่วโมงที่ 24 หลังจากที่สัตว์ตาย โดยวัดตรงส่วนของกล้ามเนื้อออกด้วยเครื่อง Meat pH meter (HANNA instruments, Romania) และบันทึกค่า pH

2.2) การประเมินค่าสีของเนื้อ (meat color measurement)

แยกกล้ามเนื้อ และกล้ามเนื้อสะโพกใส่ถุงพลาสติกผนึกปากถุงเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น นำเนื้อออกจากถุงวางในภาชนะ ชับเนื้อให้แห้ง แล้วนำมาวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี บันทึกค่าความสว่าง (L*) ค่าสีแดง (a*) และค่าสีเหลือง-น้ำเงิน (b*)

2.3) ความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (water holding capacity)

ค่าการสูญเสียน้ำของเนื้อขณะเก็บ (drip loss)

ใช้กล้ามเนื้ออกหลังจากการฆ่าที่ 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนัก (Weight drip loss; Wd) เริ่มต้น Wd₁ ประมาณ 50-60 กรัม ห่อด้วยผ้าก๊อซเก็บในถุงพลาสติกชนิดเย็น และให้ขึ้นเนื้อห่างจากกันถุง ประมาณ 2 เซนติเมตร ผนึกปากถุงให้สนิท เก็บในตู้เย็นลักษณะแขวนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อออกจากถุงซับน้ำด้วยกระดาษทิชชู ชั่งน้ำหนัก (Wd₂) คิดเป็นร้อยละของการสูญเสียน้ำจากการแช่เย็น (drip loss) จากสูตร

$$\text{ร้อยละของการสูญเสียน้ำจากการแช่เย็น} = \left[\frac{Wd_1 - Wd_2}{Wd_1} \right] \times 100$$

ค่าการสูญเสียน้ำของเนื้อจากการทำละลาย (thawing loss) และการสูญเสียน้ำจากการประกอบอาหาร (cooking loss)

ใช้กล้ามเนื้ออกและกล้ามเนื้อสะโพก หลังฆ่า 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนัก (Weight thawing loss; Wt) เริ่มต้น (Wt₁) ประมาณ 50-60 กรัม เก็บแบบสุญญากาศ (vacuum) ในถุงพลาสติกชนิดเย็นผนึกปากถุงให้สนิท เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาทำละลายน้ำแข็ง (thawing) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อออกจากถุงซับน้ำให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก (Wt₂) จากนั้นนำชิ้นเนื้อใส่ถุงร้อนแบบสุญญากาศ ต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) โดยอุณหภูมิน้ำเท่ากับ 80 องศาเซลเซียส ใช้เครื่องวัดอุณหภูมิในใจกลางเนื้อสัตว์ ประมาณ 76-78 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 15-20 นาที หลังจากนั้นผึ่งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 1 ชั่วโมง นำชิ้นเนื้อออกจากถุง ซับน้ำให้แห้ง ชั่งน้ำหนัก (Wt₃) คิดเป็นร้อยละของการสูญเสียน้ำจากการทำละลาย (thawing loss) และร้อยละของการสูญเสียน้ำขณะประกอบอาหาร (cooking loss) จากสูตร

$$\text{ร้อยละของการสูญเสียน้ำจากการทำละลาย} = \left[\frac{Wt_1 - Wt_2}{Wt_1} \right] \times 100$$

$$\text{ร้อยละของการสูญเสียน้ำขณะประกอบอาหาร} = \left[\frac{Wt_2 - Wt_3}{Wt_2} \right] \times 100$$

การศึกษาสัณฐานวิทยาของลำไส้เปิดเนื้อ

การวัดสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กของเปิดเนื้อ เมื่อเปิดอายุ 8 สัปดาห์ สุ่มเปิดเนื้อ 5 ตัวต่อกลุ่ม การทดลอง (ซ้ำละ 1 ตัว) เก็บตัวอย่างลำไส้เล็ก 3 ส่วน คือ ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) และลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) โดยการเก็บตัวอย่างลำไส้เล็กนั้นจะตัดลำไส้แต่ละส่วนยาวประมาณ 2 เซนติเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ จากนั้นจะเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์โดยจะทำการ serial dehydration ตัดชิ้นเนื้อหนา 5 ไมโครเมตร (จำนวน 6 ชิ้นต่อแต่ละส่วนลำไส้) ด้วย microtome และวางชิ้นเนื้อบนแผ่นสไลด์แล้วย้อมสีด้วย Hematoxylin และ Eosin ส่วนการวัดความสูงของวิลไล (villi) ความลึกของคริปต์ออฟไลเบอร์คูน (crypt of lieberkuhn) โดยวิเคราะห์ทั้งหมด 10 วิลไลต่อสไลด์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และใช้วิธีการวิเคราะห์ภาพถ่ายด้วยโปรแกรม Image-Pro plus Version 3.1, Media Cybernetics โดยการวัดความสูงของวิลลัส (villous height) วัดจาก Villus tip ถึง Villus-crypt junction วัดความกว้างของวิลลัส (villous width) บริเวณกึ่งกลางของความสูงของวิลลัส และวัดความลึกของคริปต์ออฟไลเบอร์คูน (cryptal depth) โดยวัดความลึกระหว่าง 2 วิลไลที่อยู่ติดกัน แล้วคำนวณพื้นที่ผิวของวิลลัส (Villus surface area) โดยพื้นที่ผิวของวิลลัส = x ความกว้างของวิลลัส \times ความสูงของวิลลัส

การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

การสกัด RNA และการสังเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิค Reverse Transcription – PCR

นำตัวอย่างม้าม (จากกรณีศึกษาที่ 1 และ 2) ที่ถูกเก็บไว้ใน RNA-Lock Reagent (Omega Bio-tek, Inc, USA) มาสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมดด้วย RiboZol™ RNA (VWR Life science, USA) แล้วนำไปวัดค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ RNA ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (NANO-300 Micro Spectrophotometer, China) โดยค่าความบริสุทธิ์ของ RNA มี OD A260/A280 > 1.8 และการสังเคราะห์ cDNA ด้วยชุดน้ำยา iScript Reverse Transcription supermix for RT-PCR (Bio-rad, USA) ตามวิธีการที่บริษัทแนะนำ หลังจากนั้นนำ cDNA เพิ่มปริมาณเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันด้วยเทคนิค qPCR

ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันด้วยเทคนิค Real-time PCR

หลังจากนั้นนำ cDNA เพิ่มปริมาณเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ยีน *IFN- α* , *IFN- β* , *IFN- γ* , *IL-6*, *IL-10*, *TLR3*, *MX* และ *GAPDH* (Table 6)

จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Roche LightCycler (LC-480 Real-Time PCR System; Roche Life Science, U.S.) โดยมีส่วนผสมของสารเรืองแสง LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Life Science, USA) และ นำค่า Cycle threshold (CT) ที่ได้มาคำนวณ เพื่อวิเคราะห์ การแสดงของยีน *IFN- α* , *IFN- β* , *IFN- γ* , *IL-6*, *IL-10*, *TLR3* และ *MX* ด้วยสูตร Relative normalized expression $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Test sample} - \Delta Ct \text{ Calibrator sample}$) (Kareem et al. 2016) ที่ปริมาณสัมพันธ์กับระดับการแสดงออกของยีน *GAPDH* และรายงานผล เป็นค่าเฉลี่ย (Mean)

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติปัจจัยด้านรูปแบบการเลี้ยง

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูล จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีตเมนต์ ในระบบ การเลี้ยงของฟาร์มเกษตรกรท้องถิ่น และอุตสาหกรรมการเลี้ยงเปิดทางการค้า ทดสอบสมมติฐานโดย group *t-test* และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วย Duncan's new multiple range test โดยโปรแกรม Statistical Analysis System (SAS)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติปัจจัยด้านอาหาร

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้งหมดมาวิเคราะห์ข้อมูล ตามแผนการทดลองแบบสุ่ม สมบูรณ์ Completely randomized design (CRD) โดยใช้ Proc. GLM (Generalized Linear Model) ด้วยโปรแกรม SPSS (SPSS, 2019) โดยมีโมเดล ดังนี้

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

เมื่อ Y_{ij} = ค่าสังเกตแต่ละค่าที่ได้ที่ทรีตเมนต์ i ซ้ำ j , μ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมดในการทดลอง T_i = อิทธิพล ของอาหารทดลอง e_{ij} = ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง และค่า P -value < 0.05 เปรียบเทียบ ความแตกต่างของค่าเฉลี่ย (Mean) ด้วยวิธี Duncan's New Multiple-Range test

Table 6 The primer sequences of immune related genes

Gene	Sequence (5'-3') (Forverse-Reverse)	Product size (bp)	GenBank No.
<i>IFN-α</i>	TCC TCC AAC ACC TCT TCG AC	232	EF053034
<i>IFN-α</i>	GGG CTG TAG GTG TGG TTC TG		
<i>IFN-β</i>	AGA TGG CTC CCA GCT CTA CA	210	KM035791.1
<i>IFN-β</i>	AGT GGT TGA GCT GGT TGA GG		
<i>IFN-γ</i>	GCT GAT GGC AAT CCT GTT TT	247	AJ012254
<i>IFN-γ</i>	GGA TTT TCA AGC CAG TCA GC		
<i>IL-6</i>	TTC GAC GAG GAG AAA TGC TT	150	AB191038
<i>IL-6</i>	CCT TAT CGT CGT TGC CAG AT		
<i>IL-10</i>	CTG ACC TCC TAC CAG CGA AG	179	NM001310368
<i>IL-10</i>	CTC CAT GTA GAA CCG CAT CA		
<i>TLR3</i>	GAG TTT CAC ACA GGA TGT TTA C	200	JQ910167
<i>TLR3</i>	GTG AGA TTT GTT CCT TGC AG		
<i>MX</i>	TGC TGT CCT TCA TGA CTT CG	153	GU202170.1
<i>MX</i>	GCT TTG CTG AGC CGA TTA AC		
<i>GAPDH</i>	ATG TTC GTG ATG GGT GTG AA	176	AY436595
<i>GAPDH</i>	CTG TCT TCG TGT GTG GCT GT		

IFN- α = Interferon alpha, *IFN- β* = Interferon beta, *IFN- γ* = Interferon gamma, *IL-6* = Interleukin-6, *IL-10* = Interleukin-10, *TLR3* = Toll-like receptor 3, Myxovirus resistance and *GAPDH* = Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase

การศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร (gut microbiota) เปิดเนื้อด้วยเทคนิค High-Throughput Sequencing (Next-Generation Sequencing; NGS)

นำตัวอย่าง microbiota ในไส้ตั้ง (จากกรณีศึกษาที่ 1 และ 2) ที่ถูกเก็บใน tube 2.0 มิลลิลิตร มาสกัดดีเอ็นเอ ปริมาตร 200 มิลลิกรัม ด้วยชุดน้ำยา QIAamp DNA Stool Mini (Qiagen, Valencia, Ca, USA) ตามคำแนะนำของบริษัท แล้วนำไปวัดค่าความเข้มข้นและความ

บริสุทธิ์ของ DNA ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (NanoDrop รุ่น 2000 Thermo Science, USA) โดยค่าความบริสุทธิ์ของ DNA มี OD A260/A280 > 1.8 นำสารละลาย DNA ที่สกัดได้จากของเหลวในไส้ตั้งปรับความเข้มข้น 10 นาโนกรัม และตรวจสอบดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้ด้วยไพรเมอร์ 343 F-TACGGRAGGCAGCAG (Liu et al., 2007) 784R-TACCAGGGTATCTAA TCCT (Andersson et al., 2008) ซึ่งอยู่บริเวณตำแหน่งของยีน 16S rRNA (GenBank number J01695) หลังจากนั้นตรวจสอบ PCR product ที่ได้ด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วย agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 2 เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งานในขั้นตอนต่อไป

16s rRNA sequencing

เพิ่มปริมาณ DNA ของแบคทีเรีย ด้วยเทคนิค PCR ที่ตำแหน่ง V3-V4 ของยีน 16s rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่ตำแหน่ง 341F และ 806R โดยจะได้ PCR product ขนาด 460 bp ซึ่ง PCR reaction ทำโดยใช้ Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs, USA) หลังจากนั้นตรวจสอบ PCR product ที่ได้ด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วย agarose gel ความเข้มข้นร้อยละ 2 PCR product ที่มีขนาด 400-450 bp จะถูกตัดออกมาจากเจลและสกัดออกมาให้บริสุทธิ์ด้วย Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany)

สร้าง Sequencing library ด้วย NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina ประเมินคุณภาพ DNA Library ด้วย Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific, USA) และ Agilent Bioanalyzer 2100 system ซึ่ง Library ที่ได้จะถูกรวมเข้ากับ PhiX control V3-V4 (5%, v/v) (Illumina) เต็ม reagent cartridge ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และนำเข้าเครื่อง Illumina MiSeq (500 cycle) สำหรับขั้นตอน sequencing ซึ่ง sequence ทั้งหมดที่ได้จะถูกตรวจสอบผ่านเว็บไซต์ Illumina BaseSpace®

การประมวลผลข้อมูล Sequence และการวิเคราะห์ Bioinformatics

นำข้อมูล paired-end reads ที่ได้ มาทำการการ ตัดส่วนที่เป็น บาร์โค้ด และไพรเมอร์ ออก และรวม paired-end reads ที่มีส่วน overlap เข้าด้วยกัน โดยใช้โปรแกรม FLASH (V1.2.7) sequences ที่ผ่านการตัดต่อแล้วจะเรียกว่า raw tags จากนั้นทำการคัดกรองคุณภาพของ raw tags ที่ได้เพื่อให้ได้ clean tags ที่มีคุณภาพด้วยโปรแกรม QIIME2 (V2018.11) นำ tags คัดกรองคุณภาพแล้วมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลอ้างอิง Gold database โดยใช้ UCHIME algorithm (UCHIME Algorithm) ในการตรวจสอบ chimera sequences เพื่อลบข้อมูล chimera sequences ออกไป ข้อมูล Clean sequence ที่ได้จะถูกนำมาใช้วิเคราะห์ทาง bioinformatics โดยกลุ่ม sequences ที่

มีความเหมือนกันที่ร้อยละ 97 จะถูกนำไปสร้างเป็น Operational Taxonomic Units (OTUs) กลุ่มของ sequences ที่ได้จะถูกนำไปเทียบกับฐานข้อมูล Green gene 16S rRNA gene database เพื่อจำแนก Taxonomy ตั้งแต่ระดับ phylum ถึง genus โดย จากนั้นทำการวิเคราะห์ค่า alpha diversity (rarefaction curve ของ OTUs, Chao1 และ PD Whole Tree) และ beta diversity ด้วยโปรแกรม QIIME 2 (Version 2018.11) และแสดงผลด้วยโปรแกรม R software



บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

ผลของรูปแบบการเลี้ยงเป็ดที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารในเป็ด

ผลของรูปแบบการเลี้ยงเป็ดที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันในเป็ด

จากการศึกษาผลของรูปแบบการเลี้ยงเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ที่มีต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน (Figure 3) พบว่า เป็ดเนื้อที่มีการเลี้ยงแบบโรงเรือนปิดมีระดับการแสดงออกของยีน *IFN- β* สูงกว่าเป็ดเนื้อที่มีการเลี้ยงแบบโรงเรือนเปิด ($P < 0.05$) สำหรับในเป็ดไข่ที่เลี้ยงแบบโรงเรือนเปิดมีระดับการแสดงออกของยีน *IFN- γ* และ *IL-10* สูงขึ้น ($P < 0.05$) แต่ระดับการแสดงออกของยีน *TLR3* ลดลง ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างรูปแบบการเลี้ยงเป็ดทั้ง 2 รูปแบบ คือ การเลี้ยงแบบโรงเรือนเปิดและการเลี้ยงแบบโรงเรือนปิดในเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการเลี้ยงแบบปิดมีระดับการแสดงออกของยีน *IFN- γ* สูง และการแสดงออกของยีน *TLR3* ลดลง เมื่อเทียบกับรูปแบบการเลี้ยงแบบเปิด ($P < 0.05$) ส่วนรูปแบบการเลี้ยงเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ทั้ง 2 รูปแบบ (Figure 4) ไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน *IFN- α* , *IFN- β* , *IL-6*, *IL-10* และ *Mx* ($P > 0.05$) นอกจากนี้การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในปัจจัยด้านสายพันธุ์ระหว่างเป็ดเนื้อและเป็ดไข่นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

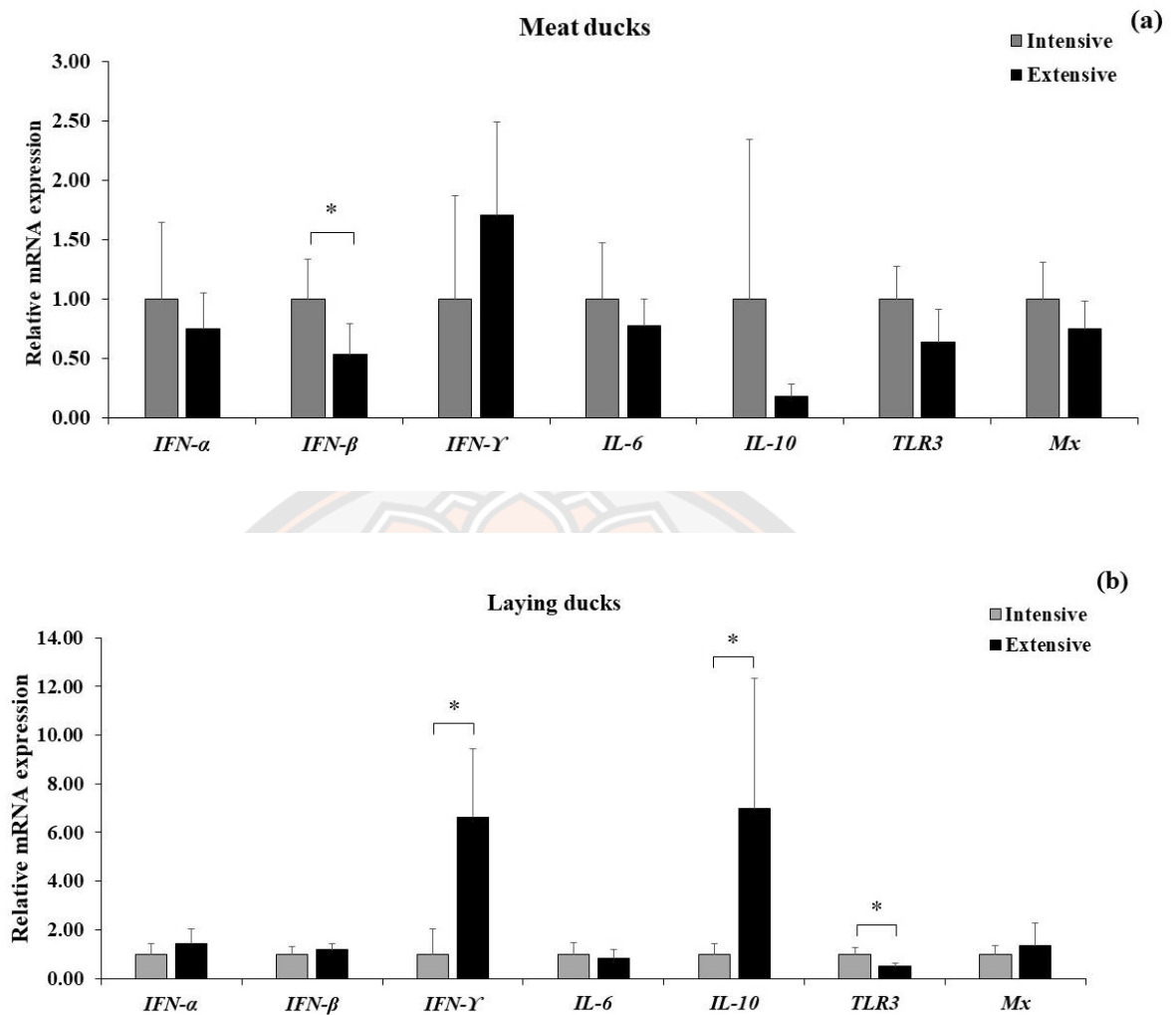


Figure 3 The relative mRNA expression of immune-related gene in the spleen of ducks between the intensive and extensive. The relative expression of meat ducks (a) and laying ducks (b). Data are expressed as relative expression of *IFN-α*, *IFN-β*, *IFN-γ*, *IL-6*, *IL-10*, *TLR3* and *Mx* gene normalized to expression of GAPDH. Differences were detected with student's *t*-test were considered significant as follow: * $P < 0.05$.

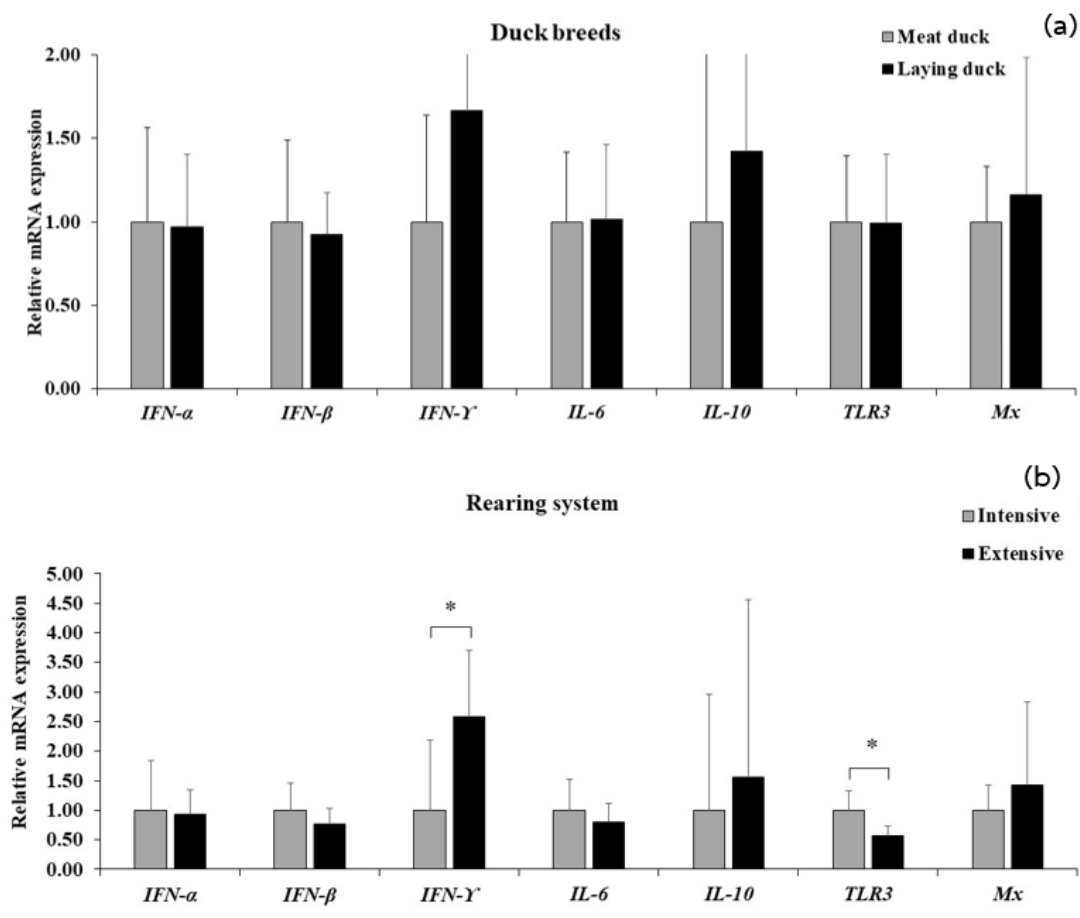


Figure 4 The relative mRNA expression of immune-related gene in the spleen of ducks between the intensive and extensive. The relative expression duck breeds (a) and rearing system (b). Data are expressed as relative expression of *IFN-α*, *IFN-β*, *IFN-γ*, *IL-6*, *IL-10*, *TLR3* and *Mx* gene normalized to expression of GAPDH. Differences were detected with student's t-test were considered significant as follow: * $P < 0.05$.

ผลของรูปแบบการเลี้ยงเป็ดที่มีต่อความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารในเป็ด

การจัดลำดับของดีเอ็นเอทั้งหมด 1,898,368 raw tags จากตัวอย่างเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ ทั้ง 2 รูปแบบในการเลี้ยงที่แตกต่างกัน ซึ่งดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (reads) ของเป็ดแต่ละตัวอยู่ในช่วงระหว่าง 83,513 ถึง 153,125 bp หลังจากตรวจสอบคุณสมบัติและลบ chimeras ด้วย high-throughput sequencing (HTS) จาก raw tags แล้ว จะได้ 1,099,180 effective tags ตัวอย่าง

แต่ละตัวถูกจัดกลุ่มเป็น Operational Taxonomic Units (OTUs) ที่ระดับคล้ายคลึงกัน $\geq 97\%$ ดังแสดงในภาพ 5 ความหลากหลายของสปีชีส์ในลำดับของ OTUs เป็นตัวแทนของตัวอย่างที่นำมาศึกษาเพิ่มเติม ซึ่งจำนวน OTUs ทั้งหมด คือ 26,185 OTUs ในกลุ่มเป็ดเนื้อที่เลี้ยงในระบบโรงเรือนแบบเปิด (MDEx) และระบบโรงเรือนแบบปิด (MDIn) มีค่า OTUs เท่ากับ 6,012 และ 4,769 ตามลำดับ ส่วนเป็ดไข่ที่เลี้ยงในระบบโรงเรือนแบบเปิด (LDEx) และระบบโรงเรือนแบบปิด (LDIn) มีค่า OTUs เท่ากับ 10,522 และ 4,882 ตามลำดับ

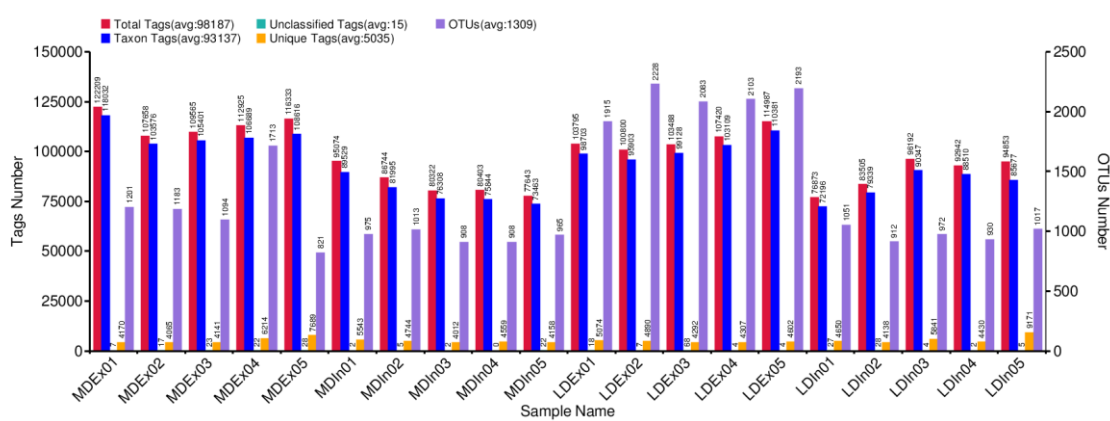


Figure 5 Statistics of each sample OTUs clustering and annotation. Total Tags (red): refers to the number of total tags each sample; Unique Tags (orange): refers to the number of tags that can't be clustering to OTUs (sequence cannot be clustered OTUs will not be used for subsequent analysis); Taxon Tags (blue): refers to the number of Tags for building OTUs and annotation information; Unclassified Tags (tea green): refers to the number of Tags without annotation information; OTUs (purple): refers to the Number of OTUs in each sample. Ducks in MDEx (MDEx01- MDEx05) and LDEx (LDEx01- LDEx05) groups had rearing extensive system, while birds in MDIn (MDIn01- MDIn05) and LDIn (LDIn01- LDIn05) group were rearing intensive system.

ปัจจัยภายนอกส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและความหลากหลายของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ เช่น การจัดการ อาหาร การใช้ยาปฏิชีวนะ วัสดุรองพื้นคอก ความหนาแน่น สิ่งแวดล้อม รวมไปถึงระบบโรงเรือน ซึ่งความหลากหลายของแบคทีเรียเหล่านี้ส่งผลต่อสุขภาพและอัตราการเจริญเติบโตของสัตว์ปีก การศึกษาบทบาทของไมโครไบโอมที่ใส่ตั้งในเป็ด จาก

การจัดลำดับยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย สามารถจำแนก Operational Taxonomic Unit (OTU) ที่ระดับคล้ายคลึงกัน $\geq 97\%$ (Table 7) เพื่อตรวจสอบประชากรจุลินทรีย์ของไส้ติ่งในเป็ดเนื้อ และเป็ดไข่ เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของจุลินทรีย์ระหว่างรูปแบบการเลี้ยงเป็ดทั้ง 2 รูปแบบ คือ การเลี้ยงแบบโรงเรือนเปิด และการเลี้ยงแบบโรงเรือนปิด (Figure 6) พบว่าจากการวิเคราะห์ α -diversity ในเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ทั้ง 2 รูปแบบไม่มีความแตกต่างกัน แต่ดัชนีที่คำนวณได้แสดงให้เห็นว่าค่า observed species หรือความหลากหลายของจุลินทรีย์ในเป็ดไข่มีค่าสูงกว่าเป็ดเนื้อ ($P < 0.05$) และรูปแบบการเลี้ยงแบบโรงเรือนเปิดมีค่า observed species ($P < 0.001$) รวมทั้งค่าดัชนี Shannon และ Simpson สูงกว่ารูปแบบการเลี้ยงแบบโรงเรือนปิด ($P < 0.05$)

Table 7 The microflora microbial diversity index (Chao, ACE, Simpson, Shannon, and Coverage) of each duck

Parameters	Sample name	observed species	Shannon	Simpson	Chao1	ACE	Coverage
Meat ducks	Extensive	1072.60	6.07	0.95	1212.30	1251.12	0.997
	Intensive	889.80	6.89	0.97	951.21	951.34	0.997
Laying ducks	Extensive	1890.00	6.63	0.95	2127.96	2185.04	0.994
	Intensive	912.40	6.87	0.97	977.59	978.69	0.998
Duck breeds	Meat ducks	981.20	6.48	0.96	1081.76	1101.22	0.998
	Laying ducks	1401.20	6.75	0.96	1552.78	1581.87	0.996
Rearing system	Extensive	1481.30	6.35	0.95	1670.13	1718.07	0.996
	Intensive	901.10	6.88	0.97	964.40	965.02	0.999
SEM	Meat ducks	138.82	0.37	0.01	148.75	156.25	<0.001
	Laying ducks	59.30	0.23	0.01	95.10	73.54	<0.001
	Duck breeds	90.19	0.13	0.01	106.75	111.30	<0.001
	Rearing system	153.75	0.23	0.01	173.88	175.72	0.001
P-value	Meat ducks	0.12	0.002	0.01	0.064	0.11	0.45
	Laying ducks	0.61	0.08	0.49	0.29	0.39	0.22
	Duck breeds	0.03	0.29	0.96	0.04	0.05	0.12
	Rearing system	<0.001	0.043	0.010	<0.001	<0.001	0.014

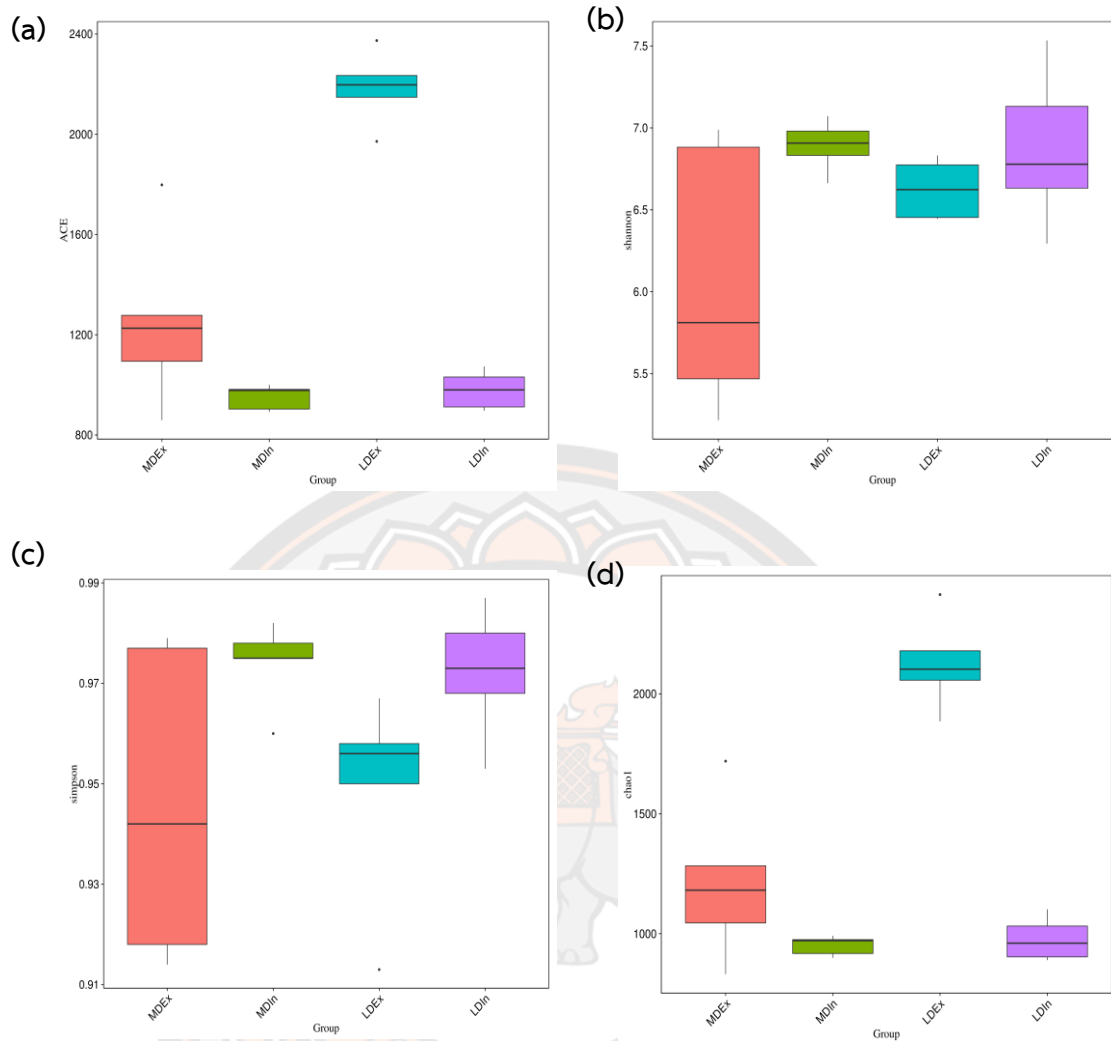


Figure 6 The α -diversity including Reads ACE (A), Shannon (B), Simpson (C), and Chao1 (D) in duck breeds on different rearing systems.

จากเส้นโค้ง Species accumulation curves (SAC) มีแนวโน้มลดลงเมื่อจำนวนตัวอย่างที่วิเคราะห์เพิ่มขึ้นถึง 20 ตัวอย่าง ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าตัวอย่างการศึกษาในครั้งนี้เพียงพอสำหรับการทดสอบ OTU และสามารถทำนายความสมบูรณ์ของสปีชีส์ของตัวอย่างได้ (Figure 7)

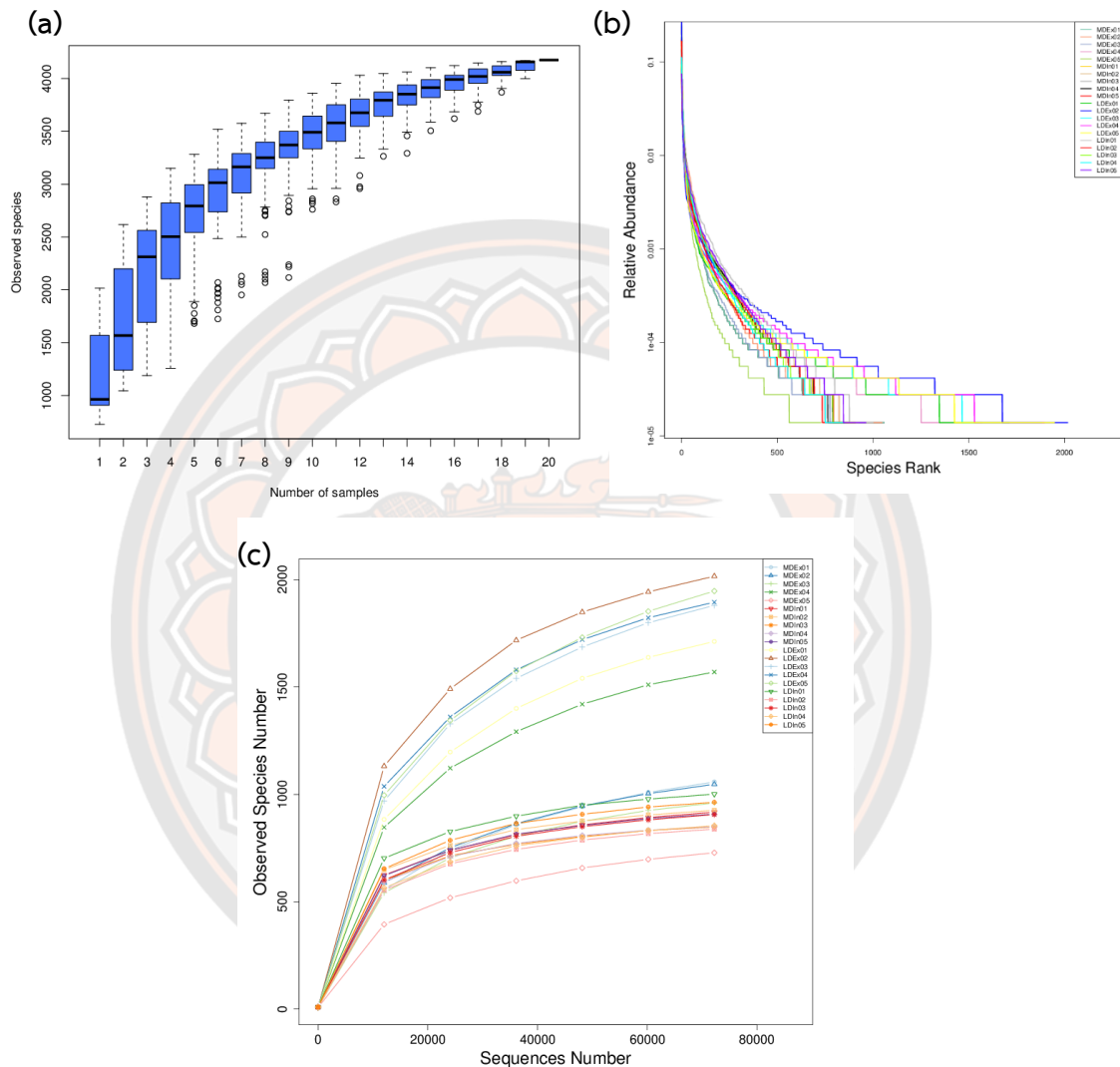


Figure 7 Species richness and diversity analysis of different groups. (a) Species accumulation curves of the current study. (b) The rank abundance curve of different duck samples in rearing system. (c) The rarefaction curve of all the birds in rearing system. Ducks in MDEx (MDEx01-MDEx05) and LDEx (LDEx01- LDEx05) groups had rearing extensive system, while birds in MDIn (MDIn01- MDIn05) and LDIn (LDIn01-LDIn05) group were rearing intensive system.

นอกจากนี้ แบคทีเรีย 100 สกุลแรก ดังแสดงในภาพ 8 พบแบคทีเรียหลักทั้งหมด 6 สกุล ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงทั้งในกลุ่ม MDEX, MDIn, LDEX และ LDIn ได้แก่ Bacteroides, Fusobacterium, Prevotella_7, Desulfovibrio, Mucispirillum และ Brachyspira แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าเปิดเนื้อและเปิดไข่ที่เลี้ยงระบบโรงเรือนแบบเปิด (MDEX และ LDEX) จะพบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมามากกว่าเปิดเนื้อและเปิดไข่ที่เลี้ยงระบบโรงเรือนแบบปิด (MDIn และ LDIn) เช่น Fusobacterium, Prevotella_7, Desulfovibrio และ Brachyspira

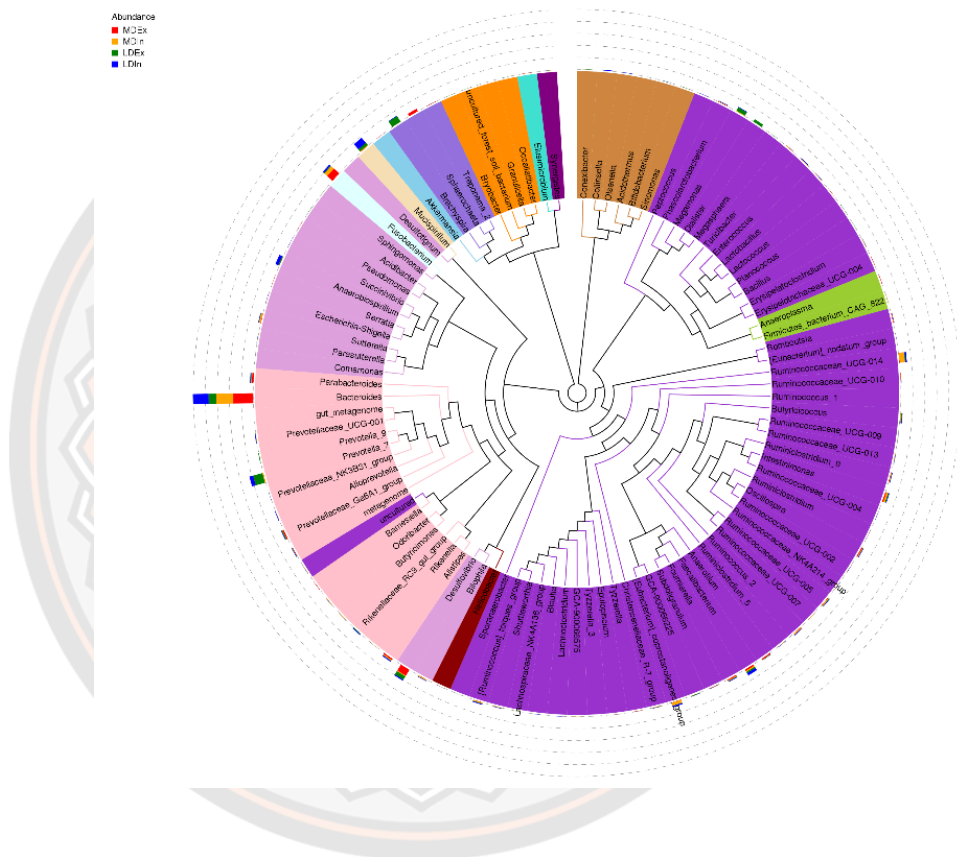


Figure 8 Species classification tree in the samples. Different colors fan represented different samples in circle. The size of Fan refers to the microorganism classification of relative abundance in the sample. Ducks in MDEX (MDEX01- MDEX05) and LDEX (LDEX01- LDEX05) groups had rearing extensive system, while birds in MDIn (MDIn01- MDIn05) and LDIn (LDIn01- LDIn05) group were rearing intensive system.

การวิเคราะห์ดัชนีความหลากหลายของแบคทีเรียในเป็ดแต่ละตัว ดังแสดงในภาพ 9 เพื่อประเมินความแตกต่างของแบคทีเรียในเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ที่ระบบการเลี้ยงแตกต่างกัน ซึ่งอ้างอิงจากการวิเคราะห์ระหว่าง weighted UniFrac

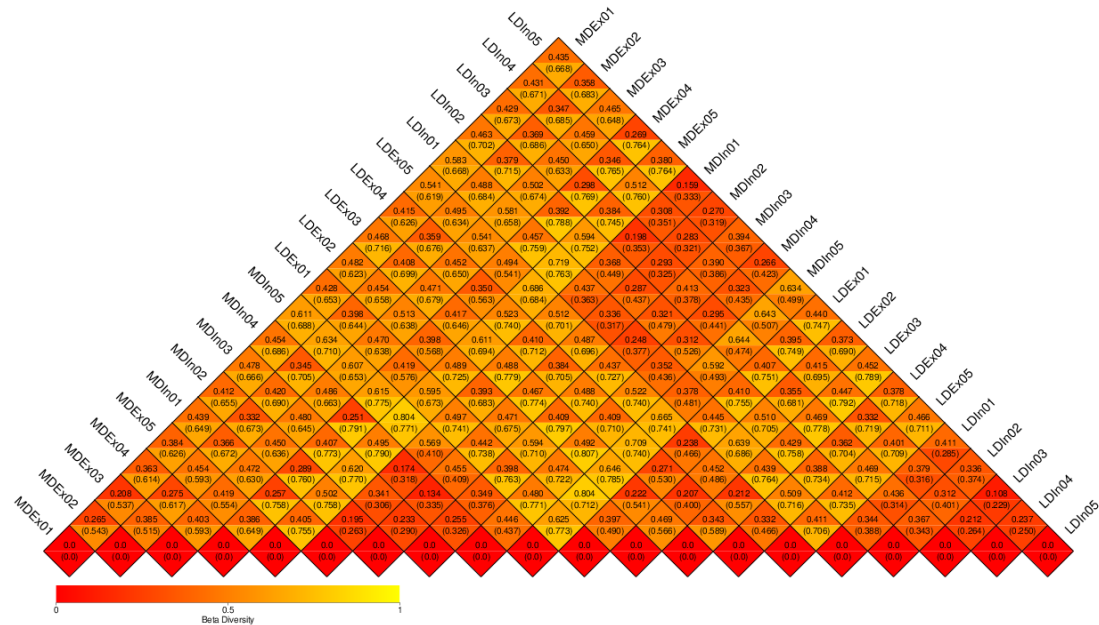


Figure 9 Comparative analysis of the beta diversity heatmap of Beta diversity indices. The difference coefficient in MDEX, MDIn, LDEX and LDIn groups was indicated by the number in each square. The disparity in species diversity decreased with decreasing difference coefficient. The upper and lower numbers in the same square stand for the weighted and Unweighted UniFrac distances (mean ± SEM), respectively. Ducks in MDEX (MDEX01- MDEX05) and LDEX (LDEX01- LDEX05) groups had rearing extensive system, while birds in MDIn (MDIn01- MDIn05) and LDIn (LDIn01- LDIn05) group were rearing intensive system.

Unweighted UniFrac ซึ่งเป็นค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่าง (Figure 10) ค่าสัมประสิทธิ์ที่สัมพันธ์กันน้อย สามารถบ่งชี้ได้ว่าความแตกต่างของสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่น้อยลง จากการศึกษาพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างของความหลากหลายของแบคทีเรียระหว่าง MDEx และ LDEx เท่ากับ 0.408 (0.582) ความหลากหลายของแบคทีเรียระหว่าง MDEx และ MDIn เท่ากับ 0.384 (0.763) ความหลากหลายของแบคทีเรียระหว่าง MDEx และ LDIn เท่ากับ 0.341 (0.781) ความหลากหลายของแบคทีเรียระหว่าง LDEx และ LDIn เท่ากับ 0.352 (0.776) และ ความหลากหลายของแบคทีเรียระหว่าง LDEx และ MDIn เท่ากับ 0.405 (0.780) ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ที่สัมพันธ์กันในกลุ่ม MDIn และ LDIn จะเห็นได้ว่าความหลากหลายของแบคทีเรียเท่ากับ 0.254 (0.365) มีค่าน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์สัมพันธ์กับกลุ่มอื่น ๆ

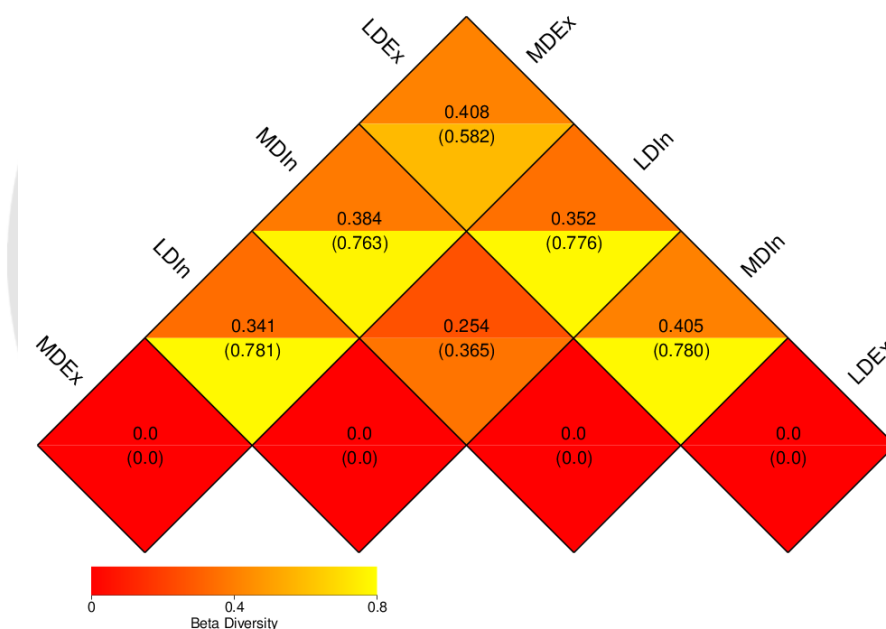


Figure 10 Beta diversity (weighted UniFrac) among 4 strains. Beta diversity indexes were measured based on weighted UniFrac and unweighted UniFrac distances. The upper numbers in the grid represent the weighted UniFrac; and the lower numbers in the grid represent the unweighted UniFrac distances, respectively. Ducks in MDEx (MDEx01-MDEx05) and LDEx (LDEx01- LDEx05) groups had rearing extensive system, while birds in MDIn (MDIn01- MDIn05) and LDIn (LDIn01-LDIn05) group were rearing intensive system.

การวิเคราะห์แบบ *t-test* สำหรับความแตกต่างของจุลินทรีย์ในระดับไฟลัม ดังแสดงในภาพ 11 เป็นการเปรียบเทียบเปิดเนื้อที่เลี้ยงในรูปแบบที่แตกต่างกัน พบว่าเปิดเนื้อที่เลี้ยงระบบโรงเรือนแบบปิด (MDIn) ความอุดมสมบูรณ์ของจุลินทรีย์ Firmicutes เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และ Enterococcus ลดลง ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเปิดเนื้อที่เลี้ยงระบบโรงเรือนแบบเปิด (MDEx) ส่วนการเปรียบเทียบเปิดไข่ที่เลี้ยงในรูปแบบที่แตกต่างกัน พบว่าเปิดไข่ที่เลี้ยงระบบโรงเรือนแบบเปิด (LDEx) ความอุดมสมบูรณ์ของจุลินทรีย์ Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, WPS-2, Verrucomicrobia และ Gemmatimonadetes เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเปิดไข่ที่เลี้ยงระบบโรงเรือนแบบปิด (LDIn)

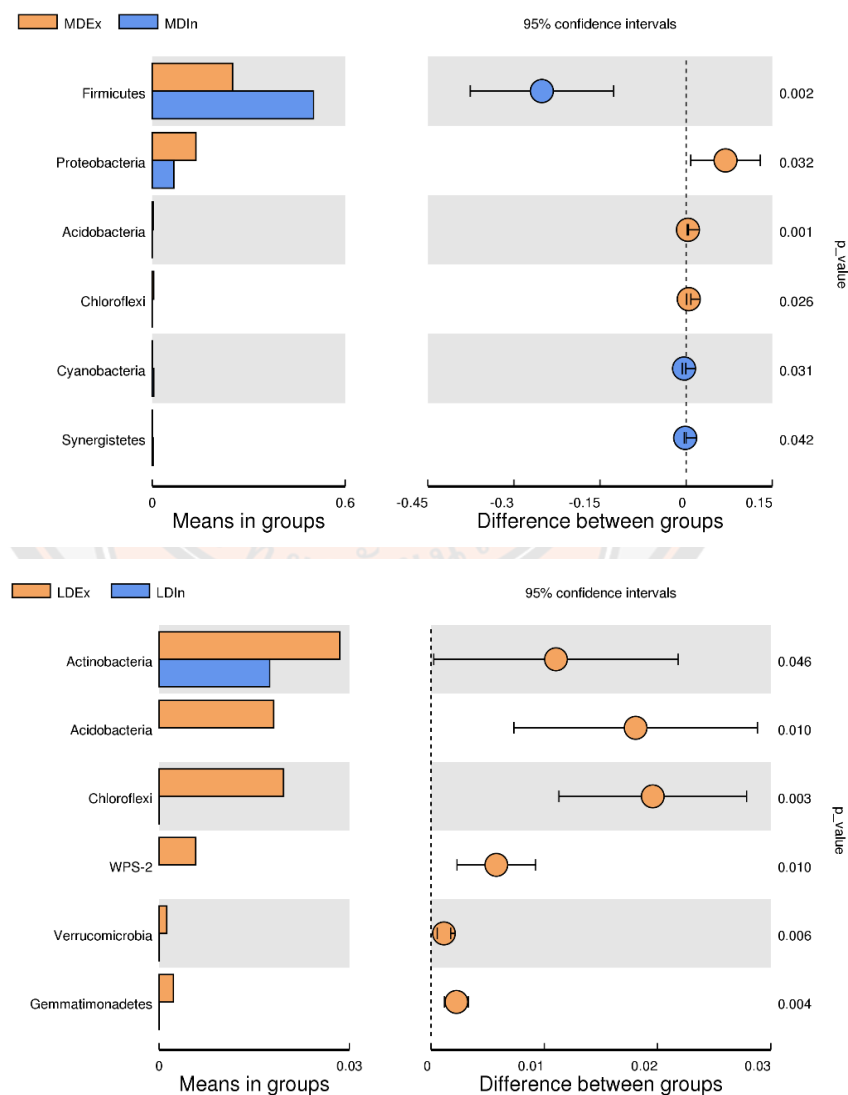


Figure 11 Effects of rearing systems on the cecal microbiota of meat and layer ducks.

การเปรียบเทียบเปิดเนื้อและเปิดไข่ที่เลี้ยงในระบบโรงเรือนแบบเปิด ดังแสดงในภาพ (MDEx และ LDEx) พบว่าเปิดไข่ (LDEx) ความอุดมสมบูรณ์ของจุลินทรีย์ Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi, WPS-2 และ Gemmatimonadetes สูงกว่าเปิดเนื้อ (MDEx) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ส่วนเปิดเนื้อที่เลี้ยงระบบโรงเรือนแบบปิด (MDIn) ความอุดมสมบูรณ์ของจุลินทรีย์ Firmicutes เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และ Actinobacteria ลดลง ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเปิดไข่ (LDIn) จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า รูปแบบการเลี้ยง สภาพแวดล้อม และสายพันธุ์ของเปิดมีผลต่อความหลากหลายของจุลินทรีย์ในไส้ติ่งของเปิด

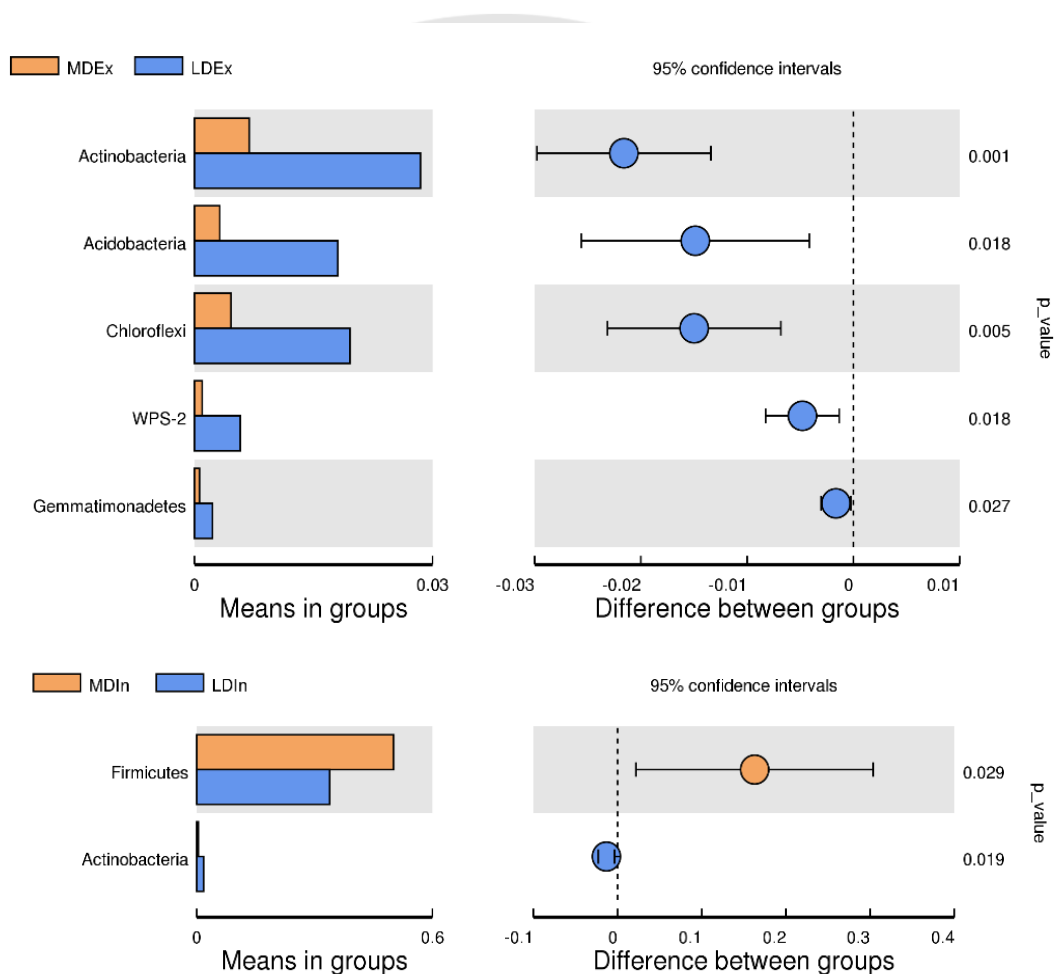


Figure 12 Effects of rearing systems on the cecal microbiota of meat and layer ducks. Differential microbes in cecal of ducks by t-test. MDEx: meat duck extensive; MDIn: meat duck intensive; LDEx: laying duck extensive and LDIn: laying duck intensive.

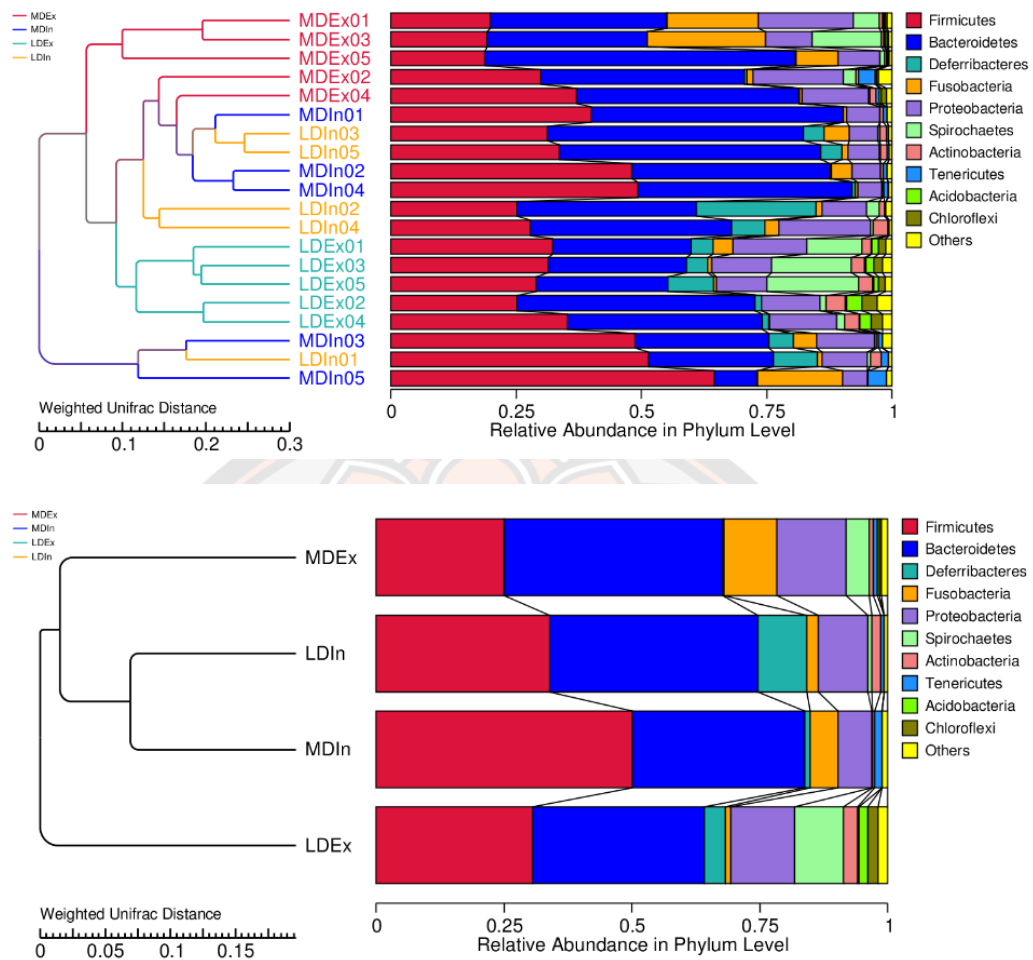


Figure 13 Beta-diversity analysis by weighted UniFrac distances among samples from the 20 samples (4 groups). Hierarchical dendrogram and cecal microbial composition for each sample at the phylum level.

Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) เพื่อศึกษาความคล้ายคลึงกันระหว่างกลุ่มตัวอย่าง และนำมาจัดกลุ่มเพื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้ ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียในไส้ตั้งของเปิดทั้ง 20 ตัวอย่าง ดังแสดงในภาพ 13 จากการศึกษพบว่าเปิดเนื้อและเปิดไข่ที่เลี้ยงระบบโรงเรือนแบบปิดมีความใกล้เคียงกันมากที่สุด และอยู่ห่างจากเปิดเนื้อและเปิดไข่ที่เลี้ยงระบบโรงเรือนแบบเปิด ซึ่งยืนยันได้ว่าสภาพแวดล้อมมีผลต่อความอุดมสมบูรณ์ของจุลินทรีย์ในไส้ตั้งของเปิดอย่างชัดเจน

พบว่าไฟลัมของแบคทีเรียที่มีมากที่สุดภายใน 10 อันดับแรกในไส้ติ่งของเป็ดเนื้อทั้ง 2 รูปแบบ คือ Firmicutes (25.30% vs. 50.69%), Bacteroidetes (43.27% vs. 33.96%), Deferribacteres (0.19% vs. 1.16%), Fusobacteria (10.50% vs. 5.46%) และ Proteobacteria (13.74% vs. 6.79%) ส่วนไส้ติ่งเป็ดไข่ ทั้ง 2 รูปแบบ คือ Firmicutes (31.18% vs. 34.10%), Bacteroidetes (34.22% vs. 41.13%), Deferribacteres (4.15% vs. 9.62%), Fusobacteria (1.12% vs. 2.25%) และ Proteobacteria (12.63% vs. 9.68%) (Figure 14)

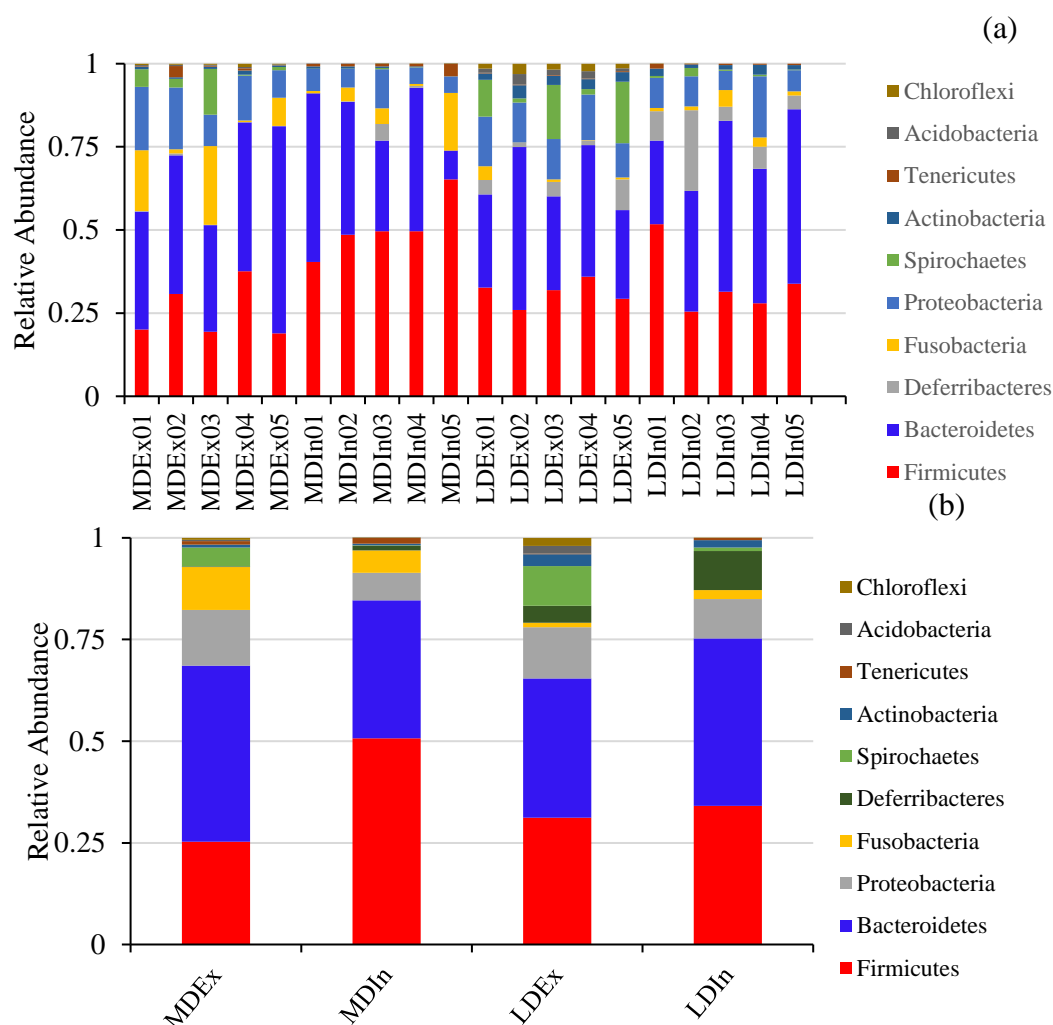


Figure 14 The microbial community structure at phylum level: (a) different ducks; (b) different groups.

ในระดับสกุล (genus) ทั้งเป็ดเนื้อและเป็ดไข่ที่ถูกเลี้ยงในรูปแบบที่แตกต่างกัน พบว่าในระดับสกุลของแบคทีเรียที่มีมากที่สุดภายใน 10 อันดับแรกในไส้ติ่งของเป็ดเนื้อทั้ง 2 รูปแบบ คือ

Bacteroides (53.37% vs. 57.76%), Prevotella_7 (<0.001% vs. 3.26%), Mucispirillum (0.36% vs. 2.69%), Fusobacterium (19.26% vs. 12.69%) และ Desulfovibrio (18.43% vs. 2.86%) ส่วนไส้ติ่งเปิดไข้ ทั้ง 2 รูปแบบ Bacteroides (20.86% vs. 45.68%), Prevotella_7 (26.31% vs. 11.16), Mucispirillum (7.81% vs. 19.26) Fusobacterium (2.06% vs. 4.50%), และ Brachyspira (17.99% vs. 1.53%) Desulfovibrio (10.57% vs. 3.23%) ตามลำดับ (Figure 15)

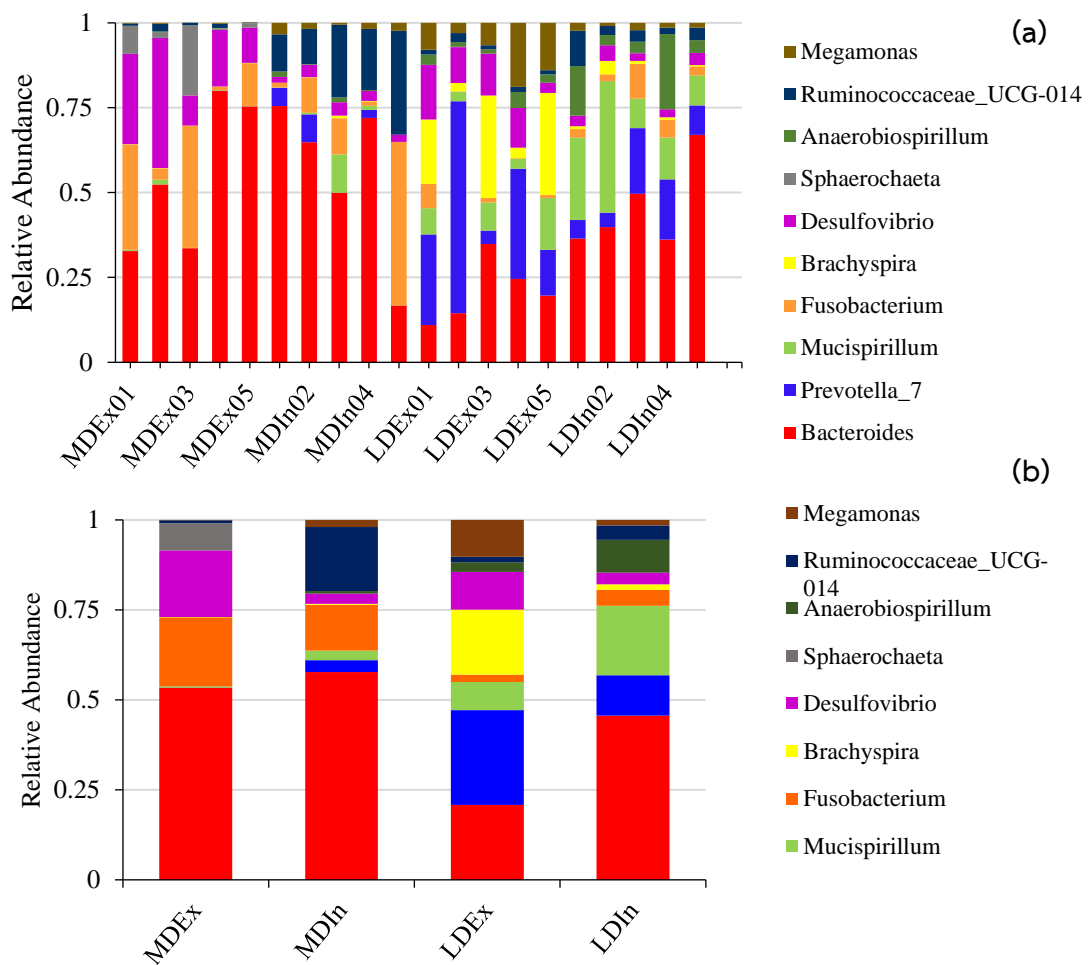


Figure 15 The microbial community structure at genus level: (a) different ducks; (b) different groups.

จากแผนภาพ Heatmap (Figure 16) มีแบคทีเรียทั้งหมด 7 ไฟล์ม และแสดงการกระจายความอุดมสมบูรณ์ของจุลินทรีย์ทั้ง 35 สกุลหลักในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด ความอุดมสมบูรณ์

ของแบคทีเรียในระดับสกุลที่มีความสอดคล้องกันค่อนข้างสูงจะแทนด้วยสีแดง หรือความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียของแบคทีเรียที่ค่อนข้างต่ำจะแทนด้วยสีน้ำเงิน จากการศึกษาคความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียทั้ง 4 กลุ่ม พบว่าเปิดไข่ที่เลี้ยงระบบโรงเรือนแบบเปิด (LDEx) มีความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียค่อนข้างสูง ได้แก่ Prevotella_9, Dialister, Brachyspira, Megamonas, GCA-900066225, และ Prevotella_7 มากกว่าเปิดกลุ่มอื่น ๆ ส่วนเปิดไข่ที่เลี้ยงระบบโรงเรือนแบบปิด (LDIn) มีความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียค่อนข้างสูง ได้แก่ Anaerobiospirillum, Mucispirillum, Prevotellaceae_UCG-001, Collinsella และ Faecalbacterium มากกว่าเปิดกลุ่มอื่น ๆ ในเปิดเนื้อที่เลี้ยงระบบโรงเรือนแบบเปิด (MDEx) ความอุดมสมบูรณ์ของแบคทีเรียค่อนข้างสูง ได้แก่ Fusobacterium, Parabacteroides, Anaerofilum, Sphaerochaeta และ Desulfovibrio มากกว่าเปิดกลุ่มอื่น ๆ พบว่าเปิดเนื้อที่เลี้ยงระบบโรงเรือนแบบปิด (MDIn) มีความอุดมของแบคทีเรียค่อนข้างสูง ได้แก่ Ruminococcus_2, Ruminococcaeae_UCG-005, Odoribacter, Sutterella, Ruminococcaeae_UCG-005, Bilophila และ Intestinimonas มากกว่าเปิดกลุ่มอื่น ๆ

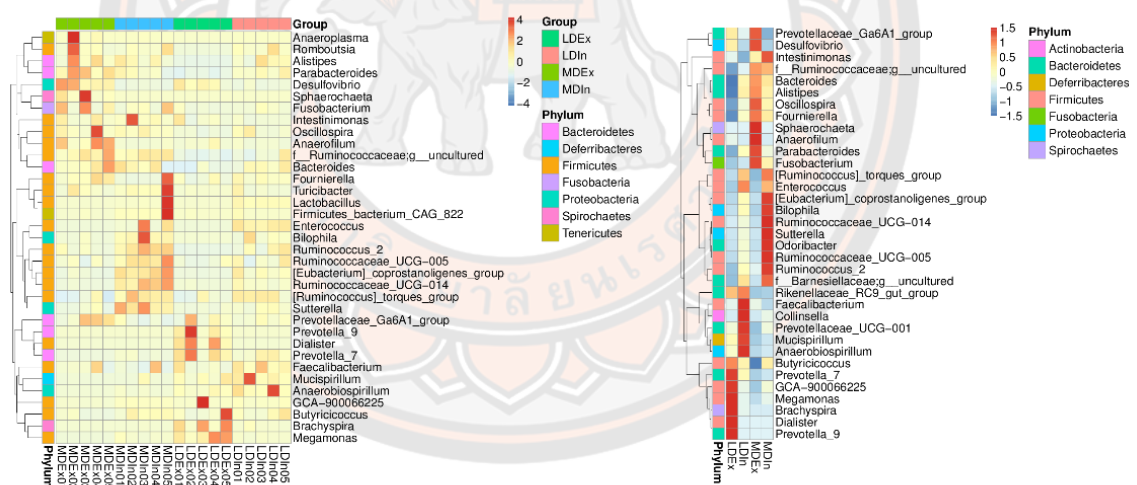


Figure 16 Heat map analysis of samples from the four groups. A heat map showing the abundances of the top 35 most abundant genera were clustered and plotted using R software. Red represents genera with relatively higher abundances in the corresponding sample, whereas blue represents genera with relatively lower abundances.

จากรูปแบบการเลี้ยงเนื้อและเปิดไข่ที่มีความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์พบว่าเปิดเนื้อและเปิดไข่ที่เลี้ยงในรูปแบบโรงเรือนปิดจะมีความหลากหลายของจุลินทรีย์ใกล้เคียง

กัน (Figure 17) และความแตกต่างกันของประชากรจุลินทรีย์ในลำไส้เปิด ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ที่มาจากของเหลวในไส้ตั้ง แสดงในภาพ PCA โดย PC1 คิดเป็นร้อยละ 61.36 ของรูปแบบทั้งหมด และ PC2 คิดเป็นร้อยละ 13.71 ทำให้ประชากรจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในรูปแบบโรงเรือนปิดมีความคล้ายคลึงกันมากขึ้น ในขณะที่ประชากรของจุลินทรีย์ในเปิดเนื้อและเปิดไข่ที่เลี้ยงด้วยรูปแบบโรงเรือนเปิดมีความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน

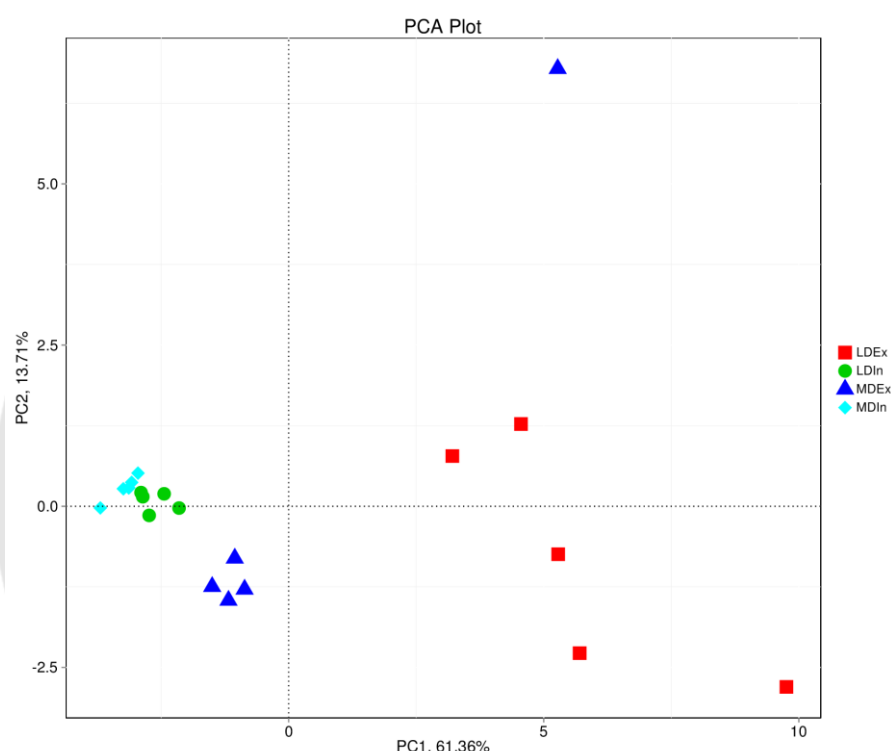


Figure 17 Principal Component Analysis (PCA) of microbial community of the ducks in MDEx, MDIn, LDEx and LDIn groups.

เนื่องจากการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของภูมิคุ้มกันจากม้ามในเปิดเนื้อและเปิดไข่ที่ถูกเลี้ยงภายใต้ความแตกต่างของระบบการเลี้ยงมีรายงานเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้ Interleukin มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสร้างความแตกต่างของเซลล์ภูมิคุ้มกันและการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน (Medzhitov et al., 2000; Schroder et al., 2004) สอดคล้องกับการศึกษาของ Yan et al. (2021) แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างกันระหว่างรูปแบบการเลี้ยงแบบตาข่ายกับการเลี้ยงแบบพื้นคอกมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของเยื่อเมือกในลำไส้ไก่เนื้อ โดยรูปแบบการเลี้ยงในกรงจะลดการแสดงออกของยีน *IL-1 β* และ *IFN- γ* กระตุ้นก่อให้เกิดการอักเสบ

ในลำไส้ของไก่เนื้ออย่างมีนัยสำคัญ Li, S. Y. (2014) ได้รายงานว่ารูปแบบการเลี้ยงในกรงจะป้องกันไม่ให้ไก่เนื้อสัมผัสกับมูลโดยตรงจะช่วยลดโอกาสในการสัมผัสกับเชื้อโรค นอกจากนี้ยังพบรอยโรคในลำไส้ของไก่เนื้อที่เลี้ยงในกรงซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันต่ำ ทั้งนี้การเลี้ยงเปิดในรูปแบบโรงเรือนปิดจะทำให้ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและคุณภาพเนื้อดีกว่ารูปแบบการเลี้ยงแบบกึ่งขังกึ่งปล่อย (Starcevic et al. 2021)

จากรูปแบบการเลี้ยงเปิดที่มีต่อความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารในเปิด จากการศึกษาของ Mao, et al. 2018 ได้รายงานว่ายีสต์ที่เรียสกุล *Desulfovibrio* มักพบในสภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก และความอุดมสมบูรณ์ของ *Desulfovibrio* ที่มีปริมาณสูงขึ้นไปในลำไส้เล็กส่วนกลางของเป็ดเพศผู้จะสอดคล้องการเผาผลาญที่เกี่ยวข้องกับกลูโคส แอมโมเนียและโรค (Chen et al. 2021) เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการเลี้ยงระหว่างโรงเรือนเปิดและโรงเรือนปิด พบว่าการเลี้ยงแบบโรงเรือนเปิดทั้งเปิดเนื้อและเปิดไข่พบ *Spirochaetes* มากกว่ารูปแบบการเลี้ยงโรงเรือนปิด เนื่องจากการศึกษาในยุโรปและสหรัฐอเมริกาพบว่าการติดเชื้อของ *Spirochaetes* ในไส้ติ่งและลำไส้มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมูลเปียก (การขับถ่ายมูลเหลว) การให้ไข่ล่าช้า อุจจาระเปื้อนเปลือกไข่ น้ำหนักไขลด ปริมาณแคโรทีนอยด์ในไขลดลง และลูกไก่เนื้อที่ฟักออกมาจะติดเชื้อจากแม่ไก่ทำให้น้ำหนักลดลง (Hampson, D. J. and Stephens. 2002) ไส้ติ่งเป็นพื้นที่หลักของจุลินทรีย์ในลำไส้และเกิดกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ที่ไม่ใช้ออกซิเจนที่มีปริมาณกรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acid, VFA) มีความสามารถในการหมักได้สูงกว่าลำไส้เล็ก (Choi et al. 2014) ซึ่งไส้ติ่งถือว่ามีหน้าที่สำคัญที่สุดต่อสุขภาพสัตว์ปีก และเป็นแหล่งสะสมเชื้อโรคที่สำคัญด้วยเช่นกัน (Singh et al. 2012; Stanley et al. 2003; Weimer et al. 2014) นอกจากนี้ความอุดมสมบูรณ์และความหลากหลายของจุลินทรีย์ในไส้ติ่งได้รับอิทธิพลจากหลายปัจจัย (Choi et al. 2015; Godfrey et al. 2017; Onrust et al. 2015) รวมทั้งระบบทางเดินอาหารถูกควบคุมโดย pH และความเข้มข้นของออกซิเจน จากการศึกษาของ Shi et al. 2022 ได้ทำการเปรียบเทียบวิเคราะห์โครงสร้างของจุลินทรีย์ในลำไส้เปิดและจากรูปแบบการเลี้ยงเปิดภายใต้สภาพแวดล้อมการเลี้ยงที่แตกต่างกัน พบว่าปัจจัยสำคัญของความหลากหลายของจุลินทรีย์ในลำไส้เปิดจะได้รับผลกระทบจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมและอาหาร (Chen et al. 2022)

ผลของการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ในเปิดต่อลักษณะประสิทธิภาพการผลิต ลักษณะซาก คุณภาพเนื้อ สันฐานวิทยาลัยการเกษตร การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน และความหลากหลายของแบคทีเรียในทางเดินอาหาร

ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตในเปิดเนื้อ

ผลของการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับที่แตกต่างกันในเปิดเนื้อต่อลักษณะประสิทธิภาพการเจริญเติบโต ดังแสดงในตาราง 8 พบว่าน้ำหนักตัว (BW) น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (BWG) อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG) ปริมาณอาหารที่กิน (FI) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (FCR) ของเปิดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ตลอดช่วงอายุของการทดลองไม่มีความแตกต่างจากเปิดเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม ($P > 0.05$) ยกเว้นสัปดาห์ที่ 3 เปิดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 mg/kg มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น (BWG) และอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG) มากกว่าเปิดเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม ($P < 0.05$) ส่วนสัปดาห์ที่ 6 และ 7 เปิดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 200 และ 500 mg/kg มีน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มเปิดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 1000 mg/kg (สัปดาห์ที่ 6 น้ำหนักเปิดเนื้อ 2,537.50, 2,557.00 และ 2,406.75 กรัม และสัปดาห์ที่ 7 น้ำหนักเปิดเนื้อ 2956.75, 2993.75 และ 2837.25 ตามลำดับ; $P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากเปิดเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม ($P > 0.05$)

Table 8 Effect of *B. toyonensis* BCT-7112^T supplemented diets on growth performance of ducks during the experimental period (1-56 days old).

Traits*	Control	200 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	SEM	P-value
Initial BW, g	46.01	45.81	46.22	46.04	0.22	0.93
1 week						
BW	149.99	151.67	150.97	148.56	1.35	0.86
BWG, g	103.98	105.86	104.75	102.52	1.28	0.82
ADG, g/day	14.85	15.12	14.96	14.65	0.18	0.82
FI, g	119.06	122.44	125.06	123.24	2.19	0.81
FCR	1.17	1.24	1.22	1.25	0.02	0.56
2 weeks						
BW	429.00	435.33	437.96	422.39	4.02	0.21

Traits*	Control	200 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	SEM	P-value
BWG, g	279.01	283.66	286.99	273.83	3.03	0.24
ADG, g/day	39.86	40.52	40.99	39.12	0.43	0.24
FI, g	378.24	391.62	384.18	379.62	5.43	0.10
FCR	1.39	1.43	1.36	1.43	0.02	0.21
Initial-2 weeks						
BWG, g	382.99	389.52	391.74	376.35	3.96	0.21
ADG, g/day	27.36	27.82	27.98	26.88	0.28	0.21
FI, g	497.30	514.06	509.24	502.86	6.59	0.10
FCR	1.33	1.37	1.32	1.38	0.02	0.20
3 weeks						
BW	886.94	901.41	922.30	866.37	7.43	0.06
BWG, g	456.99^b	465.32^{ab}	483.21^a	445.04^b	4.14	0.01
ADG, g/day	65.28^b	66.48^{ab}	69.03^a	63.58^b	0.59	0.01
FI, g	739.33	746.67	766.00	732.67	6.20	0.29
FCR	1.64	1.64	1.59	1.67	0.02	0.37
Initial-3 weeks						
BWG, g	841.20	855.54	876.191	820.10	7.37	0.06
ADG, g/day	40.06	40.74	41.723	39.053	0.35	0.06
FI, g	1236.63	1260.73	1275.24	1235.53	11.76	0.58
FCR	1.49	1.51	1.47	1.54	0.02	0.41
4 weeks						
BW	1414.58	1419.38	1431.78	1374.18	10.42	0.24
BWG, g	527.63	517.97	509.48	507.81	5.52	0.57
ADG, g/day	75.38	73.99	72.78	72.54	0.79	0.57
FI, g	975.11	965.33	986.67	945.11	9.99	0.52
FCR	1.878	1.90	1.97	1.95	0.03	0.70
Initial-4 weeks						
BWG, g	1368.84	1373.50	1385.67	1327.91	10.36	0.23
ADG, g/day	48.89	49.05	49.49	47.43	0.37	0.23

Traits*	Control	200 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	SEM	P-value
FI, g	2211.74	2226.06	2261.91	2180.62	17.24	0.44
FCR	1.63	1.64	1.64	1.67	0.01	0.77
5 weeks						
BW	1940.44	1953.8	1973.33	1888.00	11.96	0.08
BWG, g	525.87	534.40	541.56	513.82	4.91	0.22
ADG, g/day	75.12	76.34	77.37	73.40	0.70	0.22
FI, g	1193.78	1193.33	1238.00	1183.11	10.61	0.30
FCR	2.32	2.26	2.32	2.35	0.02	0.62
Initial-5 weeks						
BWG, g	1894.70	1907.90	1927.22	1841.74	11.91	0.07
ADG, g/day	54.13	54.512	55.06	52.62	0.34	0.07
FI, g	3405.52	3419.39	3499.91	3363.75	22.43	0.23
FCR	1.81	1.81	1.82	1.85	0.01	0.65
6 weeks						
BW	2485.75^{ab}	2537.50^a	2557.00^a	2406.75^b	18.47	0.02
BWG, g	545.25	584.25	578.50	523.25	9.53	0.08
ADG, g/day	77.89	83.46	82.64	74.75	1.36	0.08
FI, g	1352.25	1367.25	1380.50	1310.75	12.14	0.24
FCR	2.58	2.40	2.56	2.98	0.10	0.22
Initial-6 weeks						
BWG, g	2439.79^{ab}	2491.81^a	2510.74^a	2360.35^b	18.43	0.02
ADG, g/day	58.09^{ab}	59.33^a	59.78^a	56.20^b	0.44	0.02
FI, g	4757.77	4786.64	4880.41	4674.50	29.97	0.15
FCR	1.96	1.94	1.96	2.01	0.02	0.45
7 weeks						
BW	2925.00^{ab}	2956.75^a	2993.75^a	2837.25^b	20.25	0.05
BWG, g	439.25	419.25	436.75	430.50	9.82	0.89
ADG, g/day	62.75	59.89	62.39	61.50	1.40	0.89
FI, g	1272.50	1250.25	1225.50	1197.90	19.71	0.59

Traits*	Control	200 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	SEM	P-value
FCR	3.29	3.57	3.10	3.04	0.13	0.45
Initial-7 weeks						
BWG, g	2879.04 ^{ab}	2911.06 ^a	2947.49 ^a	2790.85 ^b	20.20	0.05
ADG, g/day	58.76 ^{ab}	59.41 ^a	60.15 ^a	56.96 ^b	0.41	0.05
FI, g	6030.27	6036.89	6105.91	5872.40	35.79	0.17
FCR	2.11	2.09	2.08	2.13	0.02	0.67
8 weeks						
BW	3297.50	3293.25	3398.50	3252.00	23.10	0.15
BWG, g	372.50 ^{ab}	336.50 ^b	404.75 ^a	414.75 ^a	8.94	0.01
ADG, g/day	53.21 ^{ab}	48.07 ^b	57.82 ^a	59.25 ^a	1.28	0.01
FI, g	1403.50	1353.50	1316.50	1301.00	44.18	0.85
FCR	4.28	4.70	4.34	3.53	0.23	0.33
Initial-8 weeks						
BWG, g	3251.54	3247.56	3352.24	3205.60	23.06	0.15
ADG, g/day	58.06	57.992	59.861	57.24	0.41	0.15
FI, g	7433.77	7390.39	7422.41	7173.40	59.41	0.39
FCR	2.30	2.29	2.23	2.27	0.02	0.50

* BW, body weight; BWG, body weight gain; ADG, average daily gain; FI, feed intake; FCR, feed conversion ratio.

** SEM, standard error of the mean (n = 50).

ลักษณะซาก (carcass traits)

ร้อยละของซาก (dressing) อวัยวะภายนอกประกอบด้วย หัวรวมคอ (head neck) ปีก (wing) ข้างรวมเท้า (legs) และโครงร่าง (skeletal) เมื่อคัตน้ำหนักร่างของชิ้นส่วนต่าง ๆ แต่ละส่วน เทียบเป็นร้อยละของน้ำหนักซาก แสดงในตาราง 9 แสดงให้เห็นว่าเปิดเนื้อที่อาหารได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับที่ 200 และ 500 mg/kg มีร้อยละของโครงร่างสูงกว่าเปิดเนื้อ กลุ่มอาหารควบคุม เท่ากับ 32.30, 32.72 และ 30.75 ตามลำดับ ($P < 0.05$) แต่ร้อยละของข้างรวมเท้าในกลุ่มเปิดเนื้อที่อาหารได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับที่ 500 mg/kg มีค่าต่ำกว่าเปิดเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม เท่ากับ 3.93 และ 4.13 ตามลำดับ ($P < 0.05$) อวัยวะ

ภายใน ได้แก่ หัวใจ (heart) กึ๋น (gizzard) ตับ (liver) กระเพาะพัก (crop) ม้าม (spleen) และกระเพาะแท้ (proventriculus) เมื่อคติน้ำหนักของอวัยวะภายในแต่ละส่วนเทียบเป็นร้อยละของน้ำหนักซากแสดงให้เห็นว่าเป็ดเนื้อที่อาหารได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับที่แตกต่างกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) และชิ้นส่วนตัดแต่งประกอบด้วย 4 ชิ้นส่วนใหญ่ (4 portion cuts) ได้แก่ ออก (breast) สะโพก (thigh) น่อง (drumstick) และสันใน (fillet) เมื่อคติน้ำหนักของชิ้นส่วนตัดแต่งแต่ละส่วนเทียบเป็นร้อยละของน้ำหนักซาก ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้พบว่าร้อยละของเนื้ออกและสันในของเป็ดเนื้อที่อาหารได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับที่แตกต่างกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

Table 9 Effect of *B. toyonensis* BCT-7112^T supplemented diets on carcass yield and visceral organs (g/100 body weight) in meat ducks at 56 days old.

Traits	Control	200	500	1000	SEM*	P-value
		mg/kg	mg/kg	mg/kg		
<i>Carcass yield (%)</i>						
Dressing	77.87	79.24	78.53	77.45	3.63	0.18
Head neck	12.67	11.45	12.05	11.80	1.09	0.08
Breast	12.55	13.53	12.41	12.68	2.49	0.40
Fillet	1.25	1.19	1.18	1.27	0.02	0.33
Thigh	13.25 ^{bc}	12.66 ^c	14.56 ^a	13.90 ^{ab}	1.42	0.01
Drumstick	12.03 ^a	10.88 ^{ab}	9.58 ^b	10.80 ^{ab}	3.16	0.04
Wing	13.18	13.06	13.32	13.35	0.62	0.83
Duck legs	4.13 ^{ab}	4.10 ^{ab}	3.93 ^b	4.38 ^a	0.10	0.03
Skeletal	30.75 ^b	32.30 ^a	32.72 ^a	31.30 ^{ab}	2.30	0.02
<i>Visceral organs (%)</i>						
Heart	0.77	0.73	0.72	0.80	0.01	0.19
Gizzard	2.96	2.74	2.83	2.96	0.13	0.45
Liver	2.89	2.80	2.81	2.75	0.14	0.86

Traits	Control	200 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	SEM*	P-value
Spleen	0.15	0.11	0.13	0.11	0.002	0.31
Proventriculus	0.53	0.46	0.45	0.43	0.01	0.06

a, b, c Mean within a row with different superscripts are different; *SEM, standard error of the mean (n = 10).

คุณภาพเนื้อ (meat quality)

ค่า pH ของเปิดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับที่แตกต่างกัน จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ค่า pH หลังฆ่า 45 นาที และ 24 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าเปิดเนื้อที่ อาหารได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับที่แตกต่างกันไม่มีความแตกต่างกันทาง สถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของสีเนื้อด้วยเครื่องวัดสี MiniScan (EZ User's Manual version 1.2, USA) และประเมินผลออกมาเป็นค่าความสว่าง (lightness; L*) ค่าความ เป็นสีแดง (redness; a*) และค่าความเป็นสีเหลือง (yellowness; b*) (Table 10) พบว่า ค่าสีเนื้อ ต่าง ๆ ของเปิดเนื้อที่อาหารได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับที่แตกต่างกันไม่ม ีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อจะพิจารณาจากค่าการ สูญเสียน้ำในรูปแบบต่าง ๆ ซึ่งจากการทดลองนี้จะพิจารณาจากค่าการสูญเสียน้ำขณะเก็บ (drip loss) ค่าการสูญเสียน้ำจากการละลาย (thawing loss) และการสูญเสียน้ำจากการประกอบอาหาร จากการต้ม (cooking loss) ซึ่งค่าต่าง ๆ ข้างต้นที่มีค่าสูงแสดงว่าเนื้อมีความสามารถในการอุ้มน้ำ ต่ำมีผลทำให้เนื้อแห้ง แข็ง และเหนียว จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า เนื้ออกของเปิดเนื้อที่ได้รับการ เสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับที่ 200 และ 500 mg/kg มีค่าการสูญเสียน้ำจากการ ละลายต่ำกว่าเปิดเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม มีค่าเท่ากับ 8.92, 8.82 และ 13.75 ตามลำดับ ($P < 0.05$) แต่เนื้อสะโพกของเปิดเนื้อที่อาหารได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ไม่แตกต่าง จากเปิดเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม ($P > 0.05$) ส่วนเปิดเนื้อที่อาหารได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับที่ 500 mg/kg มีร้อยละของเนื้อสะโพกสูง แต่ร้อยละของเนื้อน่องต่ำกว่าเปิด เนื้อกลุ่มอื่น ๆ เท่ากับร้อยละ 14.56 และ 9.58 ตามลำดับ ($P < 0.05$)

Table 10 Effect of *B. toyonensis* BCT-7112^T supplemented diets on water-holding capacity, color, and pH of meat of the ducks at 56 days old.

Traits	Control	200 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	SEM*	P-value
<i>Breast muscle composition</i>						
Drip loss (%)	7.89	6.15	7.54	7.69	0.38	0.36
Thawing loss (%)	13.75^a	8.92^b	8.82^b	12.40^{ab}	0.61	0.01
Cooking loss (%)	27.29	27.47	28.96	29.55	0.51	0.33
<i>L*</i> (Lightness)	53.72	52.03	53.25	52.34	0.35	0.29
<i>a*</i> (Redness)	14.98	15.11	15.38	14.45	0.14	0.13
<i>b*</i> (Yellowness)	8.29	7.40	7.06	7.30	0.18	0.10
pH _{45 min}	6.03	6.03	5.95	5.97	0.02	0.37
pH _{24 h}	5.96	6.00	5.88	5.92	0.02	0.21
<i>Thigh muscle composition</i>						
Drip loss (%)	6.29	5.68	6.17	6.00	0.23	0.81
Thawing loss (%)	10.15	9.04	7.54	9.61	0.44	0.19
Cooking loss (%)	27.59	27.99	27.22	28.93	0.45	0.57
<i>L*</i> (Lightness)	45.90	44.89	46.11	44.73	0.34	0.36
<i>a*</i> (Redness)	12.70	13.04	13.37	12.78	0.19	0.58
<i>b*</i> (Yellowness)	7.06	6.81	7.15	6.89	0.19	0.92
pH _{45 min}	6.02	5.92	5.92	5.99	0.03	0.59
pH _{24 h}	5.81	5.82	5.82	5.89	0.02	0.42

^{a, b, c} Mean within a row with different superscripts are different; *SEM, standard error of the mean (n = 10).

สัณฐานวิทยาลำไส้เล็กของเป็ดเนื้อ

จากการทดลองเป็ดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ในอาหารต่อ สัณฐานวิทยาของลำไส้เล็ก คือ วัดความสูงของวิลลัส (villus height) ความลึกของคริปต์ (Crypt depth) และสัดส่วนของความสูงของวิลลัสต่อความลึกของคริปต์ (villus height per crypt depth ratio) ดังแสดงในตาราง 11 พบว่าอาหารที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ไม่มีผลต่อความสูงของวิลลัส ความลึกของคริปต์ และสัดส่วนของความสูงของวิลลัสต่อความลึกของคริปต์ในลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนปลายของเป็ดเนื้อ ($P > 0.05$)

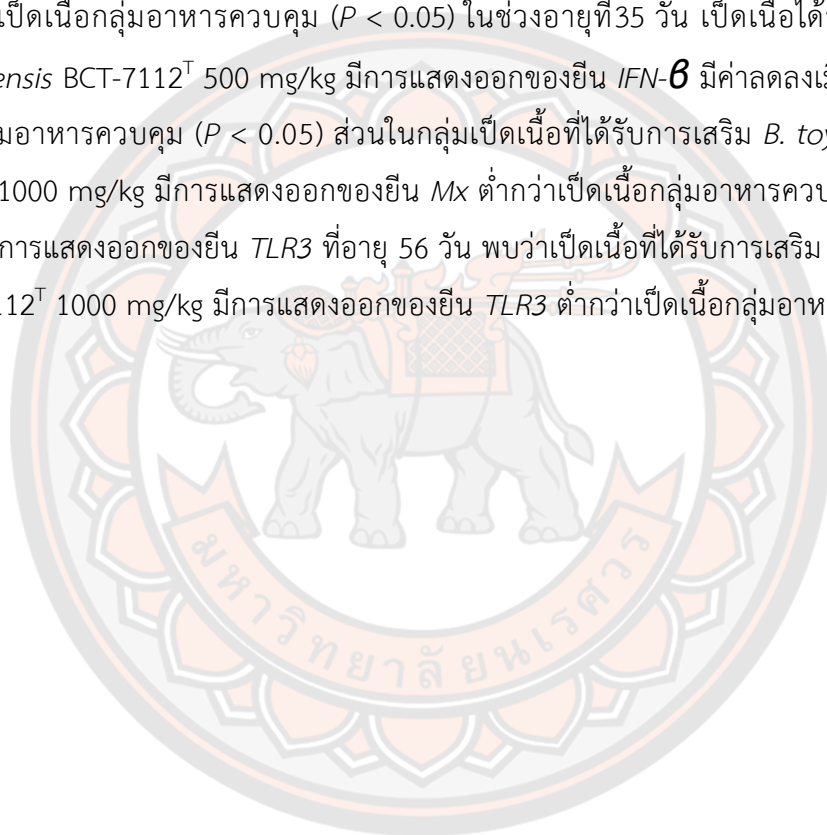
Table 11 Effect of dietary *B. toyonensis* BCT-7112^T on intestinal morphological alterations of Barbary ducks during experimental period (56 days old)

Traits	Control	500 mg/kg	1000 mg/kg	SEM*	P-value
Duodenum					
Villus height, μm	1348.11	1496.79	1424.17	53.75	0.30
Villus area, mm^2	400.00	426.11	382.24	24.29	0.53
Crypt depth, μm	206.31	212.47	170.50	8.93	0.08
Villus height: crypt depth ratio	6.75	7.32	8.64	0.46	0.16
Jejunum					
Villus height, μm	1216.26	1290.65	1132.21	55.56	0.29
Villus area, mm^2	338.78	286.83	274.59	14.97	0.12
Crypt depth, μm	143.82	163.27	123.08	12.10	0.22
Villus height: crypt depth ratio	9.60	8.69	9.41	0.94	0.72
Ileum					
Villus height, μm	511.97	699.78	664.54	42.90	0.11
Villus area, mm^2	105.50	165.89	132.99	13.92	0.17
Crypt depth, μm	106.05	112.12	123.26	5.06	0.21
Villus height: crypt depth ratio	4.89	6.38	5.57	0.40	0.12

* Standard error of means (n = 5 ducks per treatment).

ระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกล้ามเนื้อของเป็ดเนื้อ

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค quantitative Real-time PCR พบว่าตลอดช่วงระยะเวลาของการทดลอง โดยมีการเก็บตัวอย่างที่ช่วงอายุ 14, 35 และ 56 วัน (Figure 18) ของเป็ดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ในอาหาร พบว่าเป็ดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 1000 mg/kg ในช่วงอายุที่ 14 วัน มีการแสดงออกของยีน *IFN- α* และ *IFN- β* มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับเป็ดเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม ($P < 0.05$) และในเป็ดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 และ 1000 mg/kg มีการแสดงออกของยีน *IL-6* ต่ำกว่าเป็ดเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม ($P < 0.05$) ในช่วงอายุที่ 35 วัน เป็ดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 mg/kg มีการแสดงออกของยีน *IFN- β* มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับเป็ดเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม ($P < 0.05$) ส่วนในกลุ่มเป็ดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 1000 mg/kg มีการแสดงออกของยีน *Mx* ต่ำกว่าเป็ดเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม ($P < 0.05$) สำหรับการแสดงออกของยีน *TLR3* ที่อายุ 56 วัน พบว่าเป็ดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 1000 mg/kg มีการแสดงออกของยีน *TLR3* ต่ำกว่าเป็ดเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม ($P < 0.05$)



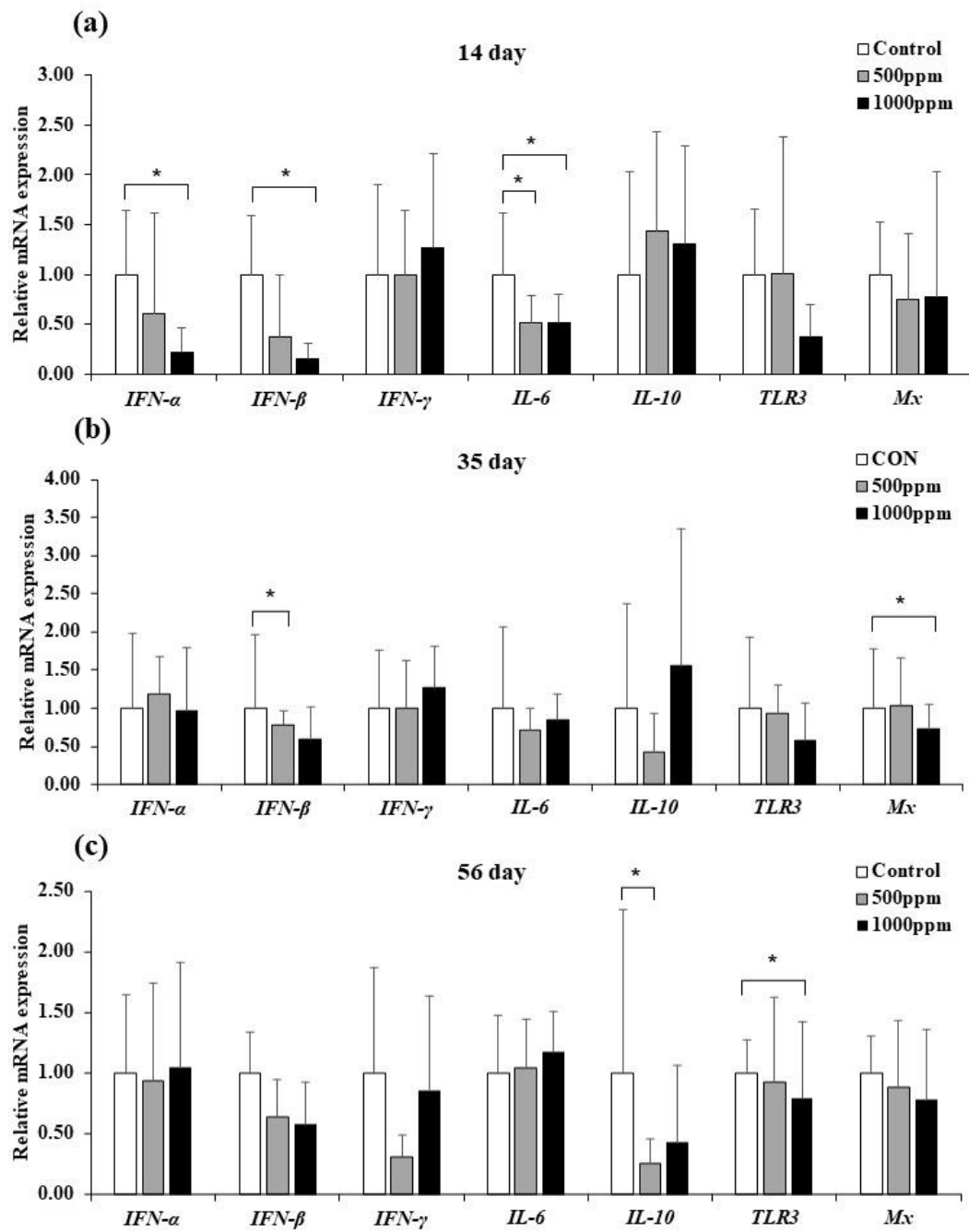


Figure 18 The effect of *B. toyonensis* BCT-7112^T supplementation on relative RNA expression in the spleen of meat ducks. (a) At 14 day of age, (b) At 35 day of age, and (c) At 56 day of age. Differences were detected with student's t-test were considered.

องค์ประกอบของไมโครไบโอตาไส้ติ่งในเปิดเนื้อ

จากการศึกษาบทบาทของไมโครไบโอตาไส้ติ่งในเปิดเนื้อ พบว่า การจัดลำดับยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย สามารถจำแนก Operational Taxonomic Unit (OUT) ที่ระดับคล้ายคลึงกัน $\geq 97\%$ (Table 12) ซึ่งความหลากหลายของแบคทีเรียเหล่านี้ส่งผลต่อสุขภาพและอัตราการเจริญเติบโตของเปิดเนื้อ พบว่าจากการวิเคราะห์ α -diversity ในดัชนีที่คำนวณได้แสดงให้เห็นว่าเปิดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 mg/kg มีค่า observed species, Chao1 และ ACE สูงกว่าเปิดเนื้อกลุ่มอื่น ๆ ($P < 0.001$)

Table 12 Alpha diversity indices statistics by sample

Sample name	Control	500 mg/kg	1000 mg/kg	SEM	P-value
Observed species	851.200 ^b	1737.000 ^a	891.000 ^b	23.014	<0.001
Shannon	6.859	7.188	7.064	0.092	0.366
Simpson	0.967	0.974	0.979	0.005	0.605
Chao1	892.949 ^b	1883.475 ^a	926.699 ^b	24.970	<0.001
ACE	897.869 ^b	1916.385 ^a	930.107 ^b	25.196	<0.001
Good coverage	0.999 ^a	0.996 ^b	0.999 ^a	0.000	<0.001

a, b, c Mean within a row with different superscripts are different; *SEM, standard error of the mean (n = 5).

นอกจากนี้ แบคทีเรีย 100 สกุลแรก ดังแสดงในภาพ 19 พบแบคทีเรียหลักทั้งหมด 4 สกุล ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงทั้งในกลุ่มเปิดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 และ 1000 mg/kg ได้แก่ Bacteroides, Ruminococcaceae_UCG-014, [Eubacterium]_coprostanoligenees_group และ Fusobacterium แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าเปิดเนื้อกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T (MCONT) จะพบเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมมากกว่าเปิดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 และ 1000 mg/kg (500 และ 1000 mg/kg) เช่น Fusobacterium เป็นต้น

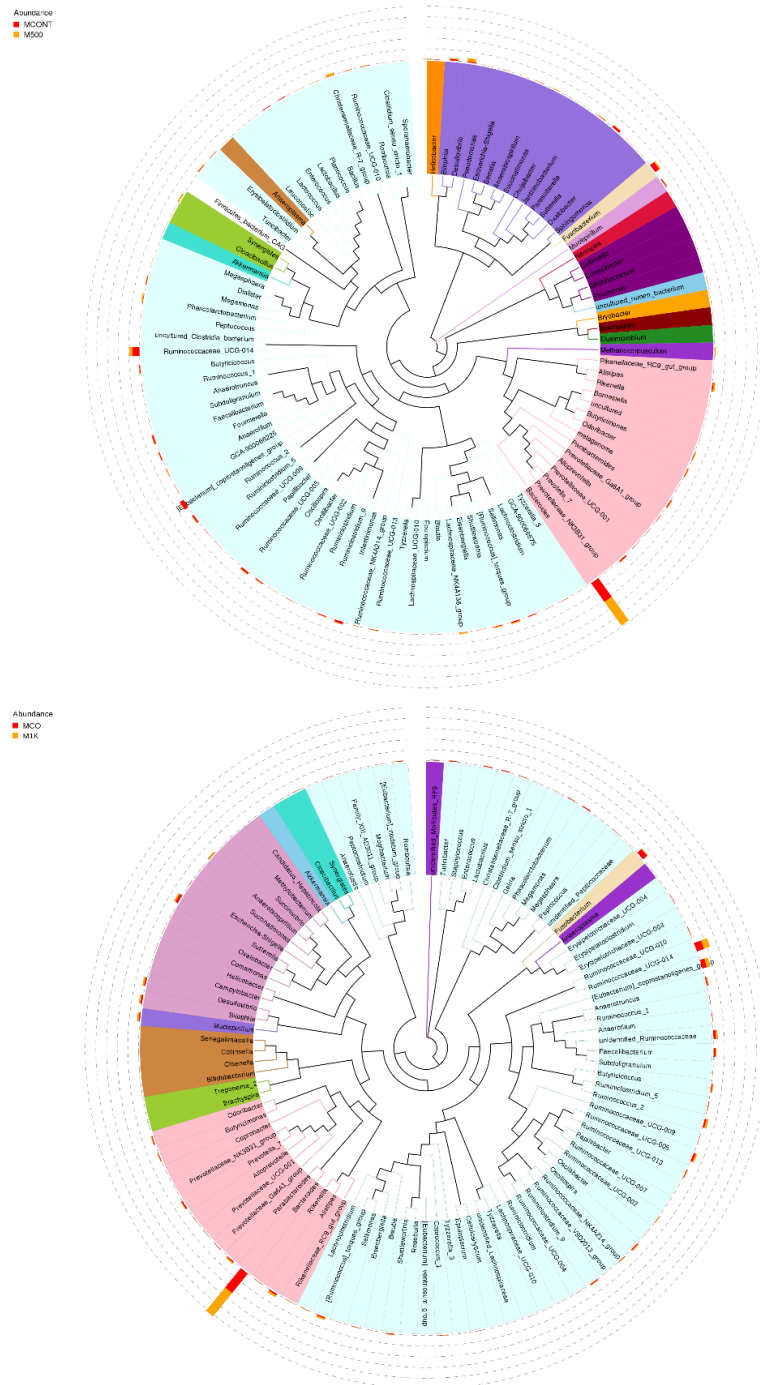


Figure 19 Species classification tree in the samples. Different colors fan represented different samples in circle. The size of Fan refers to the microorganism classification of relative abundance in the sample. Ducks in MCONT had meat duck control group, while birds in M500 and M1K were meat duck supplemented probiotic 500 mg/kg and 1000 mg/kg.

ในระดับไฟลัม Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria และ Deferribacteres เป็นไฟลัมหลัก 5 อันดับแรก ที่อยู่ในไส้ติ่งเป็ดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 และ 1000 mg/kg คิดเป็นร้อยละ 92.98 และ 97.28 ของความอุดมสมบูรณ์ทั้งหมด ตามลำดับ (Figure 20 และ 21) โดย Bacteroidetes ในเป็ดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 mg/kg เป็นไฟลัมที่โดดเด่น คิดเป็นร้อยละ 42.22 ของความอุดมสมบูรณ์ทั้งหมดที่อยู่ในไส้ติ่งของเป็ดเนื้อ ตามด้วย Firmicutes ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 37.43 แต่ Firmicutes ในเป็ดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 1000 mg/kg เป็นไฟลัมหลัก คิดเป็นร้อยละ 46.94 และ Bacteroidetes คิดเป็นร้อยละ 40.38 ของความอุดมสมบูรณ์ทั้งหมดที่อยู่ในไส้ติ่งของเป็ดเนื้อ

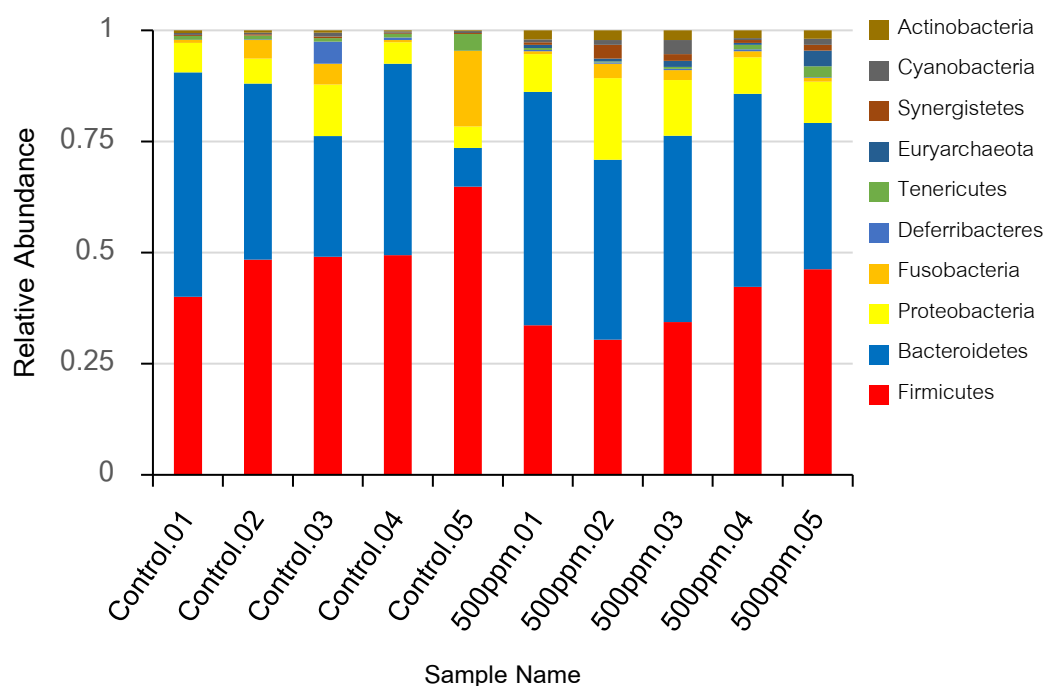


Figure 20 The top 10 phylum relative abundance of microbiota community indicate by histogram. (A) Lanes control.01-05, meat duck of control group and lanes 500 mg/kg.01-05, meat duck supplemented with *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 mg/kg group. (B) The top 10 phylum with the highest abundance in both groups.

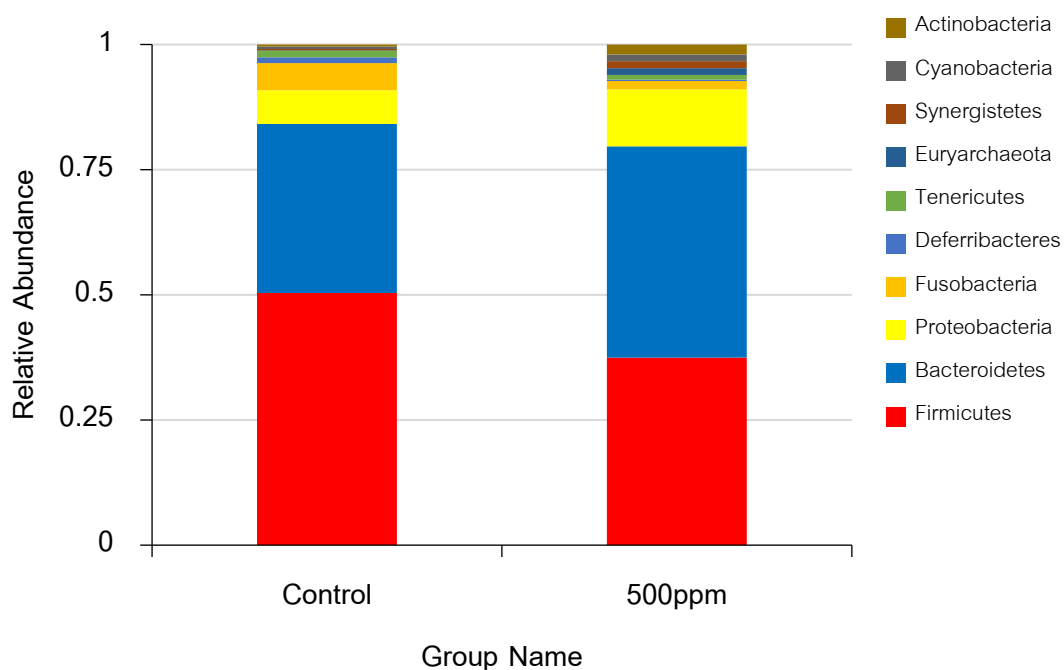


Figure 20 (Cont.)

ในระดับสกุล (genus) เป็ดเนื้อที่ได้รับ *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับที่แตกต่างกัน พบว่าในระดับสกุลของแบคทีเรียที่มีมากที่สุด 10 อันดับแรกในไส้ติ่งของเป็ดเนื้อที่ได้รับ *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับที่ 500 mg/kg เมื่อเทียบกับเป็ดเนื้อกลุ่มควบคุม (Figure 22) คือ Bacteroides (68.07% vs. 49.00), Fusobacterium (3.44% vs. 10.69), Ruminococcaceae_UCG-014 (7.72% vs. 15.09), Christensenellaceae_R-7_group (5.03 vs. 0.83), [Eubacterium]_coprostanoli-genes_group (1.17% vs. 8.80) และ Desulfovibrio (7.42% vs. 2.41%) ส่วนไส้ติ่งของเป็ดเนื้อที่ได้รับ *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับที่ 1000 mg/kg เมื่อเทียบกับเป็ดเนื้อกลุ่มควบคุม (Figure 23) คือ Bacteroides (59.78% vs. 48.62), Fusobacterium (1.69% vs. 10.62), Ruminococcaceae_UCG-014 (12.60% vs. 14.74) [Eubacterium]_coprostanoli-genes_group (7.23% vs. 8.74), และ Anaerobiospirillum (2.47% vs. 0.63%) ตามลำดับ

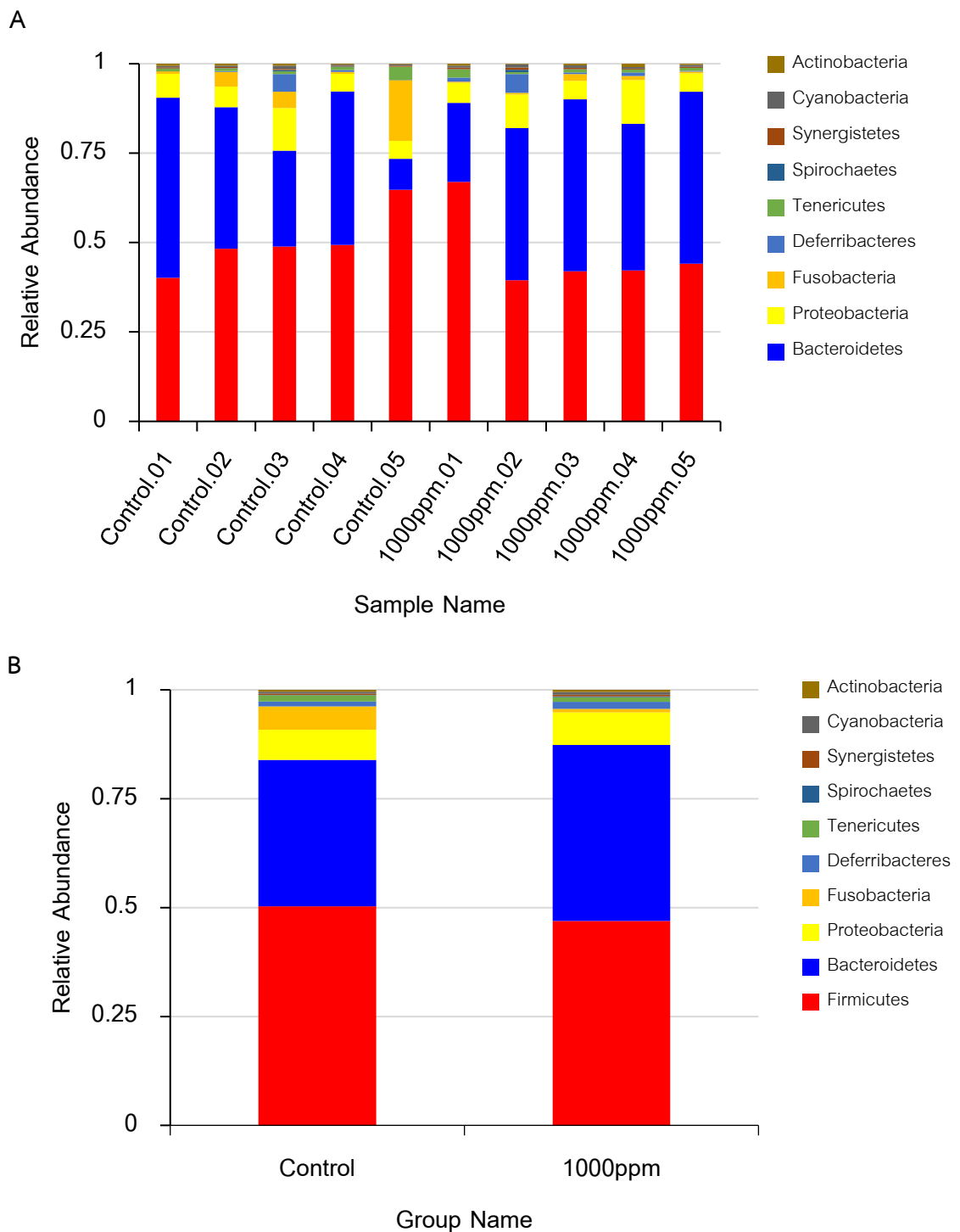


Figure 21 The top 10 phylum relative abundance of microbiota community indicate by histogram. (A) Lanes control.01-05, meat duck of control group and lanes 1000 mg/kg. 01-05, meat duck supplemented with *B. toyonensis* BCT-7112^T 1000 mg/kg group. (B) The top 10 phylum with the highest abundance in both groups.

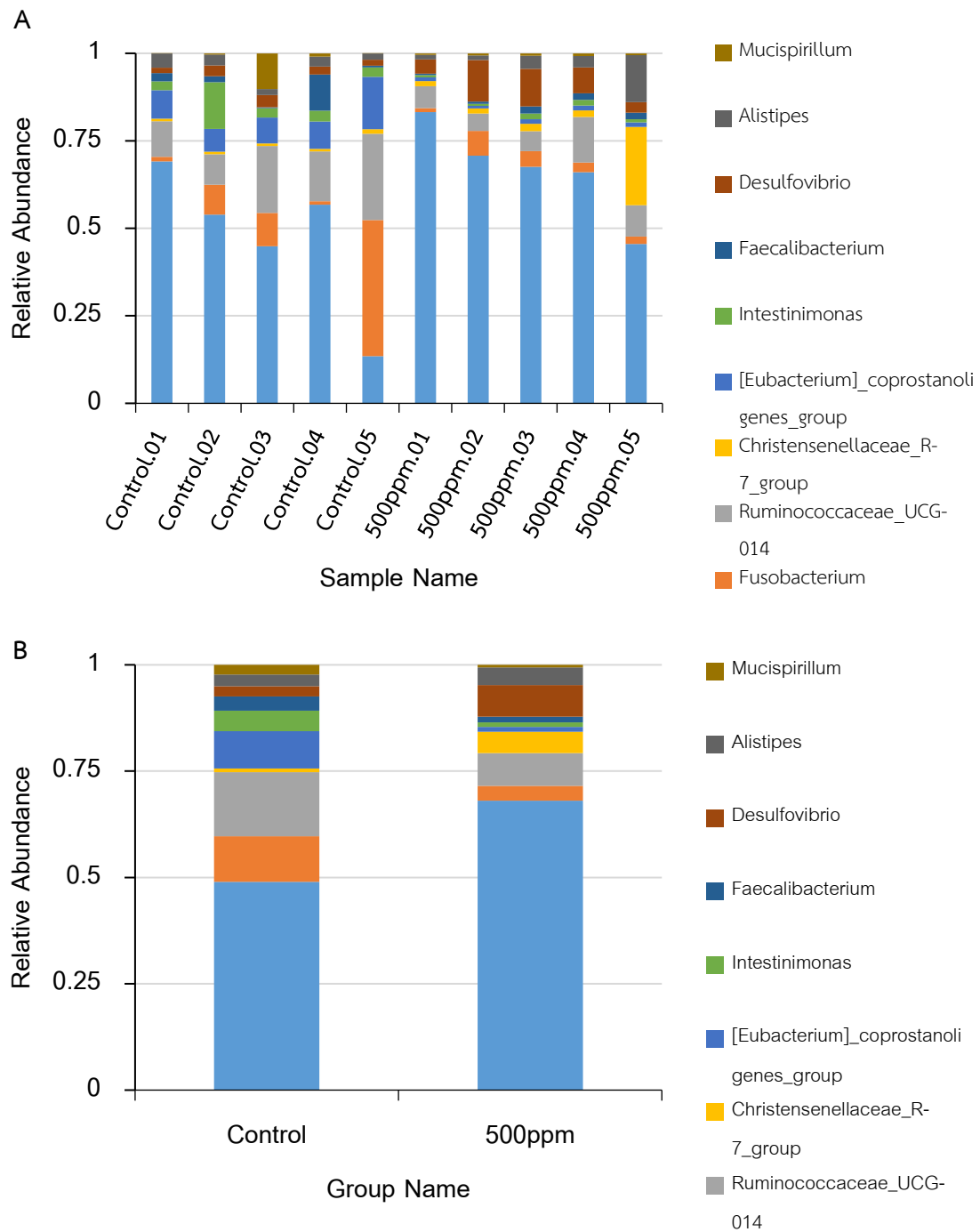


Figure 22 The top 10 genus relative abundance of microbiota community indicate by histogram. (A) Lanes control.01-05, meat duck of control group and lanes 500 mg/kg. 01-05, meat duck supplemented with *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 mg/kg group. (B) The top 10 phylum with the highest abundance in both groups.

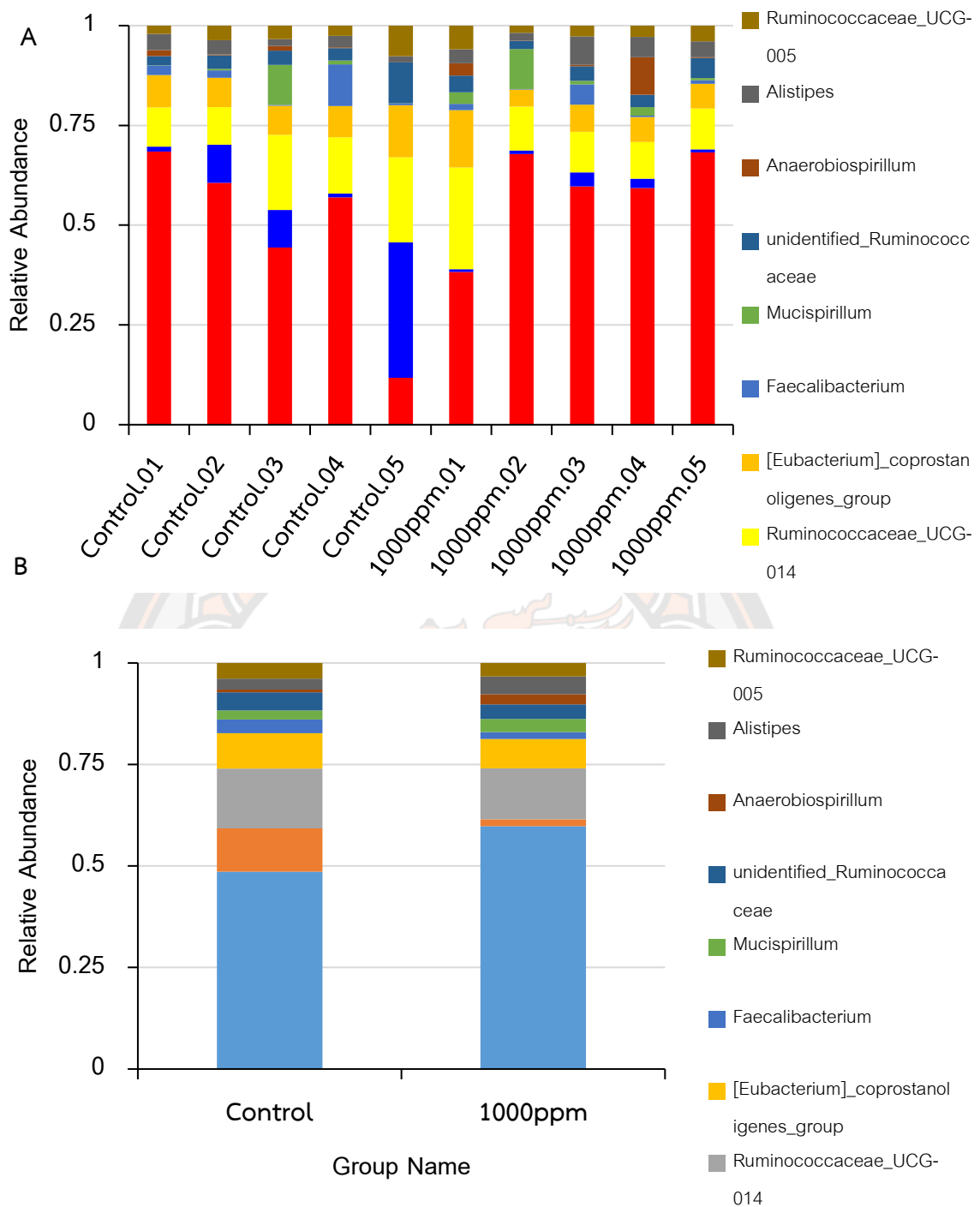


Figure 23 The top 10 genus relative abundance of microbiota community indicate by histogram. (A) Lanes control.01-05, meat duck of control group and lanes 1000 mg/kg. 01-05, meat duck supplemented with *B. toyonensis* BCT-7112^T 1000 mg/kg group. (B) The top 10 phylum with the highest abundance in both groups.

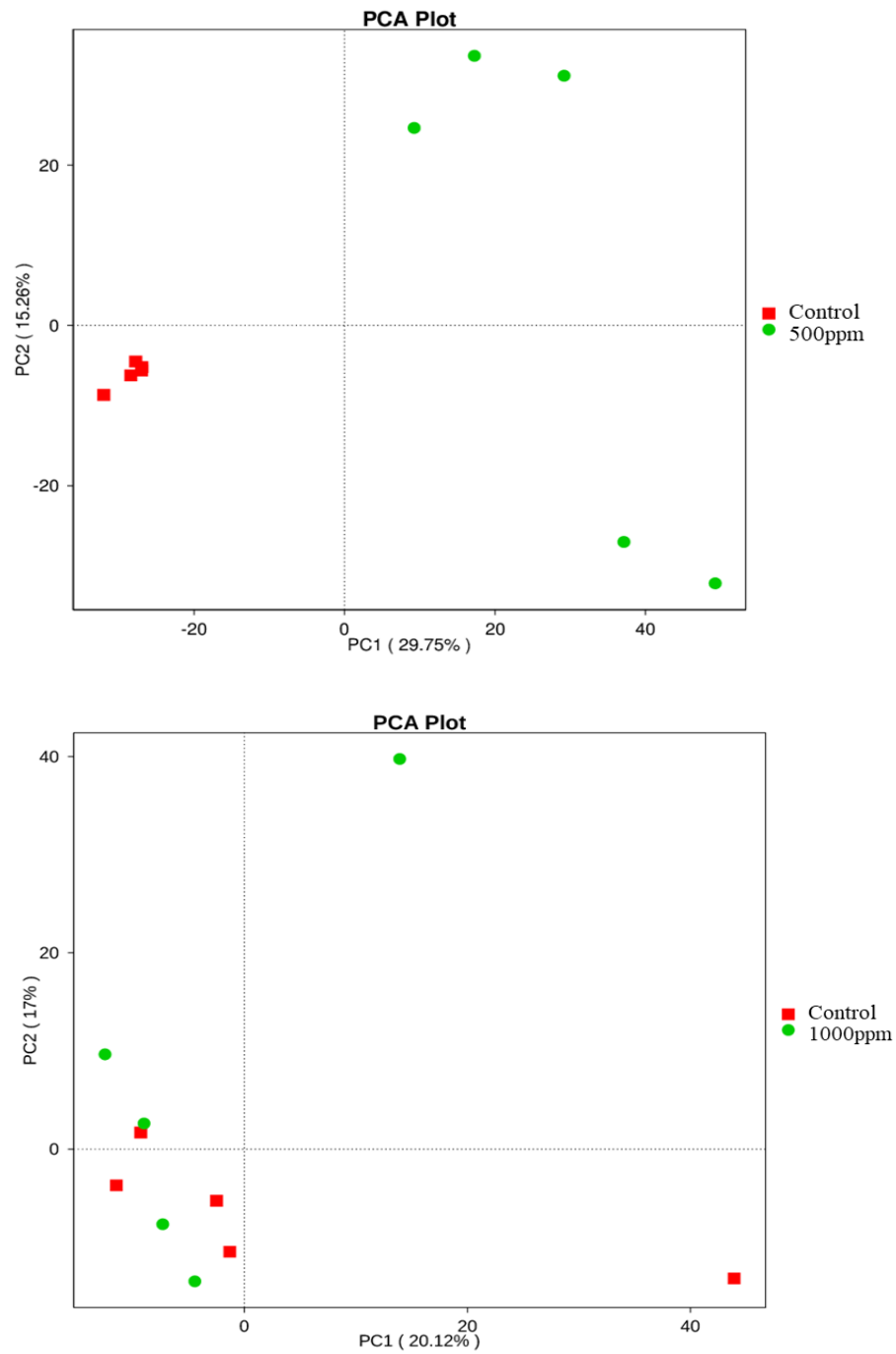


Figure 24 Principal component analysis (PCA) of the microbial community of the ducks in 500 mg/kg, 1000 mg/kg and control groups.

จากการเลี้ยงเป็ดเนื้อที่ได้รับ *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับที่แตกต่างกัน ที่มีต่อความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ พบว่าเป็ดเนื้อที่ได้รับ *B. toyonensis* BCT-7112^T ใน

ระดับ 500 mg/kg มีความหลากหลายของจุลินทรีย์แตกต่างกัน (Figure 24) แต่ในเปิดเนื้อกลุ่มควบคุมมีความหลากหลายของจุลินทรีย์ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในภาพ PCA โดย PC1 คิดเป็นร้อยละ 29.75 และ PC2 คิดเป็นร้อยละ 15.26 ในขณะที่เปิดเนื้อที่ได้รับ *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับ 1000 mg/kg ทำให้ประชากรจุลินทรีย์มีความคล้ายคลึงกันมากเมื่อเทียบกับเปิดเนื้อกลุ่มควบคุม โดย PC1 คิดเป็นร้อยละ 20.12 และ PC2 คิดเป็นร้อยละ 17

จากแผนภาพ Heatmap (Figure 25 และ 26) แสดงการกระจายความอุดมสมบูรณ์ของจุลินทรีย์ทั้ง 35 สกุลหลักในกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าเปิดเนื้อที่ได้รับ *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับ 500 mg/kg เปลี่ยนองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้เมื่อเทียบกับเปิดเนื้อกลุ่มควบคุม เนื่องจากปริมาณสัมพันธ์ที่ระดับไฟลัมของ Verrucomicrobia, Bacteroidetes, synergistetes และ Actinobacteria เพิ่มขึ้น การค้นพบนี้ชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของจุลินทรีย์ในไส้ตั้งเปิดเนื้อที่ได้รับ *B. toyonensis* BCT-7112^T



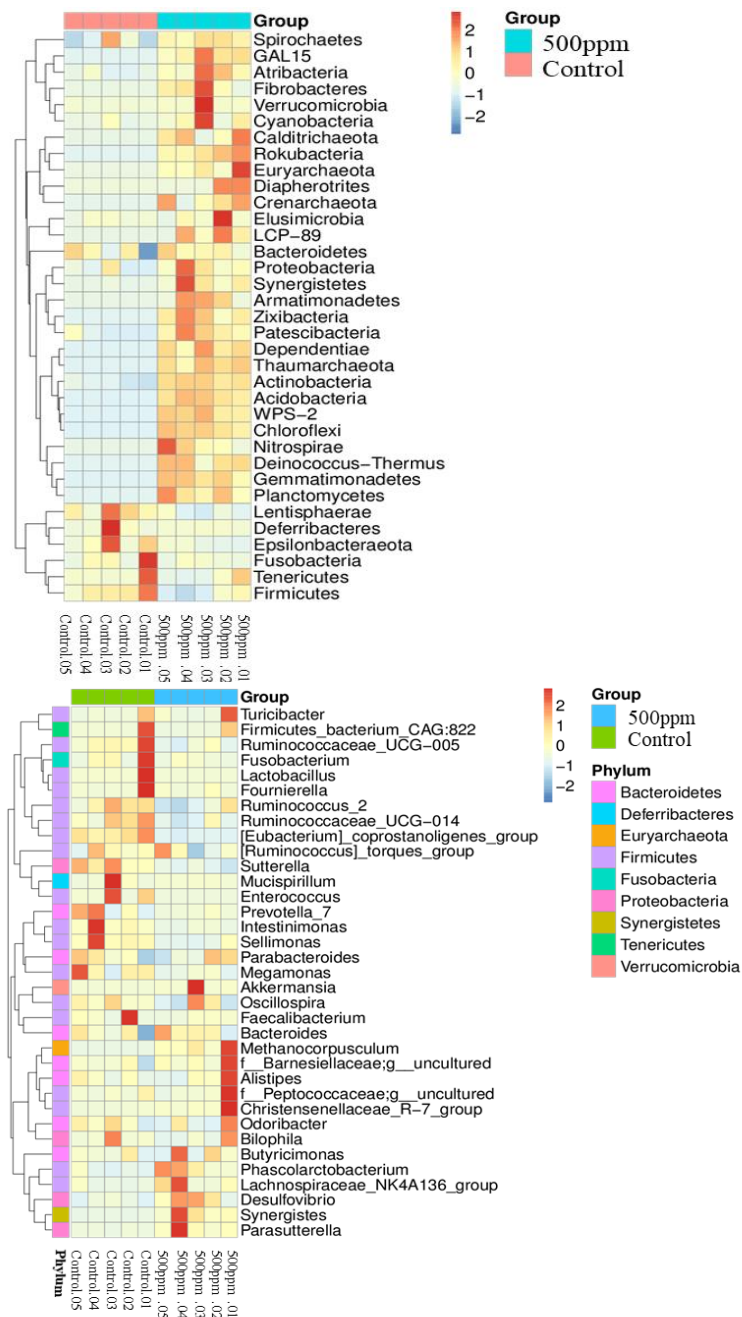


Figure 25 Heat map analysis of 35 most abundant phyla and genera of each bird was carried out in Control (Control.01- Control.05) group with basal diet and 500 mg/kg (500ppm.01-500ppm.05) group *B. toyonensis* BCT-7112^T supplement. Notes: Plotted by sample name on the X-axis and the Y-axis represents the phylum. The absolute value of 'Z' represents the distance between the raw score and the mean of the standard deviation. 'Z' is negative when the raw score is below the mean, and vice versa (rank from -2 to 2).

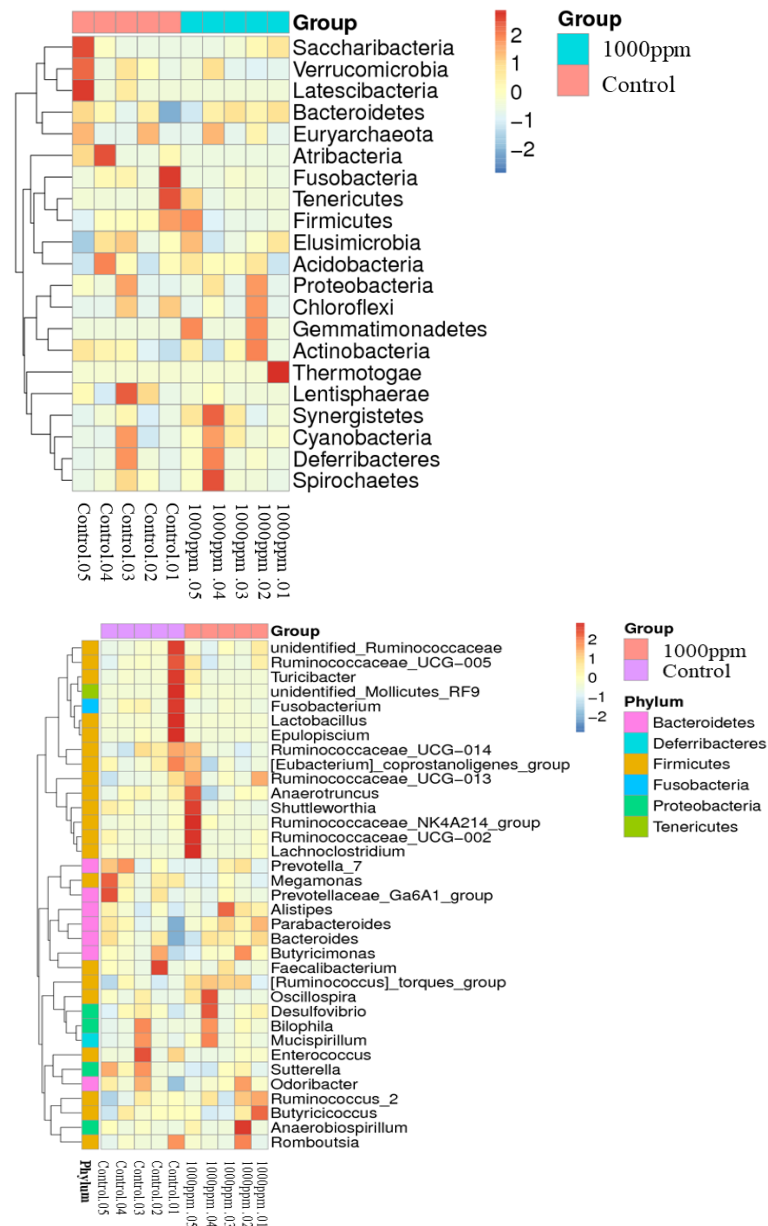


Figure 26 Heat map analysis of 35 most abundant phyla and genera of each bird was carried out in Control (Control.01- Control.05) group with basal diet and 1000 mg/kg (1000ppm.01-1000ppm.05) group *B. toyonensis* BCT-7112^T supplement. Notes: Plotted by sample name on the X-axis and the Y-axis represents the phylum. The absolute value of 'Z' represents the distance between the raw score and the mean of the standard deviation. 'Z' is negative when the raw score is below the mean, and vice versa (rank from -2 to 2).

การใช้โพรไบโอติกเป็นอาหารเสริมที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการผลิตปศุสัตว์ ซึ่งได้รับการรายงานว่ามีประโยชน์หลายประการในการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตของสัตว์ปีก เช่น การเจริญเติบโต การย่อยโภชนะ การตอบสนองของภูมิคุ้มกัน และการทำงานของลำไส้ (Li et al., 2018; Incharoen et al., 2019; Abdel-Moneim et al., 2020) จากการศึกษาสามารถบ่งชี้ได้ว่าสัตว์ปีกมีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตโดยไม่จำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะ ในทำนองเดียวกัน Someh et al. (2021) แสดงให้เห็นว่าอาหารเสริมโพรไบโอติกในไก่เนื้อที่อายุ 1 ถึง 42 วัน ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว จากการศึกษาก่อนหน้านี้ ยังรายงานด้วยว่าการเพิ่ม *B. amyloliquefaciens* ที่แตกต่างกันสามขนาด (1000, 2000 และ 3000 mg/kg) ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเป็ดสายพันธุ์ Pitalah (Zurmiati et al. 2017) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับ Lokapimasari et al. 2022 ได้ศึกษาการให้โพรไบโอติก 4 mL containing 1.2×10^8 CFU/mL ในน้ำดื่มของเป็ดปักกิ่ง พบว่า โพรไบโอติกไม่ส่งผลต่อน้ำหนักตัว อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน และประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวเช่นเดียวกัน Wang et al. (2019) และ Deepthi et al. (2017) ได้ยืนยันว่าการได้รับโพรไบโอติก *Lactobacillus plantarum* (10^9 CFU/mL ที่แยกได้จากห้องปฏิบัติการ) ไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ Vineetha et al. (2017) ได้นำเสนอผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มี *L. plantarum* LGFCP4 (10^8 CFU/g, หมายเลขอ้างอิง NCBI:KM199683) ไม่ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการเติบโตของไก่เนื้อเช่นกัน ซึ่งผลลัพธ์ที่ผันแปรนี้อาจเกิดจากความแตกต่างของสายพันธุ์โพรไบโอติก รวมทั้งประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของเป็ดเนื้อยังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น การจัดการ สภาพแวดล้อมการทดลอง อายุของสัตว์ สายพันธุ์ และโภชนาการ เป็นต้น

คุณภาพซากเป็ดเนื้อที่ได้รับการเสริมโพรไบโอติกไม่แตกต่างจากอาหารกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับ Lokapimasari et al. (2022) ในช่วงอายุที่ 8 สัปดาห์ ร้อยละของอวัยวะภายใน เช่น ร้อยละของตับจะอยู่ในช่วง 2.21-2.27 และร้อยละของกึ้นจะอยู่ในช่วง 2.28-2.48 ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Guo et al. (2021) นอกจากนี้ยังมีความสอดคล้องกับผู้เขียนคนอื่น ๆ หรือจากหลาย ๆ งานวิจัยที่ระบุว่าสารอาหารเสริมไม่ได้ทำให้เกิดความแตกต่างของอวัยวะภายใน (Awad et al. 2009; Erdogan et al. 2010)

จากคุณภาพเนื้อ พบว่าร้อยละของเนื้อมากและสันในของเป็ดเนื้อที่อาหารได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับที่แตกต่างกันไม่มีความแตกต่างกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Sahin and Yadimci. (2009) ได้ศึกษาการเสริมโพรไบโอติกชนิดผสมน้ำดื่มในห่านที่ระดับร้อยละ 2.5 และ 7.5 พบว่าเนื้อชิ้นส่วนตัดแต่ง เช่น เนื้อมาก กล้ามเนื้อขา ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังมีหลายงานวิจัยไม่สอดคล้องกันกับการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างของอาหาร สารเติมแต่ง ปริมาณอาหารที่ได้รับ อายุ เพศ การจัดการ รวมทั้งสายพันธุ์ของเป็ดเนื้อ ซึ่ง

การศึกษาในครั้งนี้มีค่า pH หลังฆ่า 45 นาที อยู่ในช่วงระหว่าง 5.97 ถึง 6.03 และค่า pH หลังฆ่า 24 ชั่วโมง อยู่ในช่วงระหว่าง 5.81 ถึง 6.00 ทั้งในกล้ามเนื้ออกและสะโพก แสดงให้เห็นว่าเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับที่แตกต่างกันนั้นจัดอยู่ในคุณภาพเนื้อที่ดี ไม่ซีด นุ่ม และไม่มีน้ำไหลออกมาจากเนื้อ หรือทำให้เนื้อเกิดสภาพที่เรียกว่า PSE (pale, soft, exudative) จากการศึกษาของ Erisir et al. (2009) ได้รายงานว่าค่า pH ปกติสำหรับเนื้อสัตว์จะอยู่ระหว่าง 5.4 ถึง 6.3

สำหรับสัณฐานวิทยาของลำไส้ Chamani (2016) รายงานว่าอาหารไก่ที่เสริมด้วย Toyocerin ทำให้สัณฐานวิทยาของลำไส้ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และ Baum et al. (2002) รายงานว่า Toyocerin ในอาหารทำให้ความยาววิลลัสเพิ่มขึ้นในลำไส้เล็กของสุกรหย่านม Guna et al. (2006) รายงานว่าในนกที่ได้รับโพรไบโอติก แบบผสม (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *S. thermophilus*, *A. orizea*, *B. bifidum*, *E. faecium* และ *C. pintolepesii*) ทำให้วิลลัสสูงขึ้นในลำไส้ส่วนกลางและส่วนปลาย ซึ่งคุณลักษณะสัณฐานวิทยาของลำไส้ส่งผลต่อการผลิตกรดไขมันสายสั้นโดยโพรไบโอติก แต่ในทางกลับกัน De Souza et al. (2018) รายงานว่าไก่เนื้อที่ได้รับอาหารที่มีโพรไบโอติก (*L. acidophilus*, *B. subtilis*, *B. bifidum* and *E. faecium*) ไม่มีผลกระทบต่อความสูงของวิลลัส ความลึกของคริปต์ ความกว้างของวิลลัส หรืออัตราส่วนของความสูงของวิลลัสต่อความลึกของคริปต์ของไก่เนื้อ Mountzouris et al (2010) ยังพบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงความสูงของวิลไลในลำไส้เล็กของไก่เนื้อที่ได้รับการผสมโพรไบโอติก (*L. reuteri*, *E. faecium*, *B. animalis*, *P. acidilactici* และ *L. salivarius*) ในอาหาร สอดคล้องกับ มนัสนันท์ และคณะ 2564 พบว่าการเสริมโพรไบโอติก 2 กรัมต่อกิโลกรัม ในไก่ไข่ไม่ส่งผลต่อความสูงของวิลลัส ความลึกของคริปต์ และอัตราส่วนของความสูงของวิลลัสต่อความลึกของคริปต์ของลำไส้เล็กทั้ง 3 ส่วน และสอดคล้องกับ ยิวเรศ เรืองพานิช และพิเชษฐ ศรีบุญยงค์ (2562) ได้ศึกษาผลของการใช้โพรไบโอติก (GUT PRO) ต่อสัณฐานวิทยาของลำไส้ของไก่เนื้อ พบว่าการเสริมโพรไบโอติกชนิดผสมน้ำดื่มที่ระดับ 0.5 และ 1.0 มิลลิลิตร ต่อน้ำดื่ม 5 ลิตร ไม่มีผลต่อสัณฐานวิทยาของลำไส้รวมทั้งลำไส้เล็ก ส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนปลาย จากการศึกษาในครั้งนี้ เนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับต่าง ๆ ตลอดการทดลอง (8 สัปดาห์) สัณฐานวิทยาลำไส้ไม่เปลี่ยนแปลง อาจอธิบายได้ว่าจุลินทรีย์ทั้งหมดในแต่ละกลุ่มการทดลองไม่สามารถสร้างกรดไขมันสายสั้นในระดับต่าง ๆ เพื่อกระตุ้นการพัฒนาทางสัณฐานวิทยาของเยื่อบุผิวในลำไส้ในเนื้อได้ และเป็นสิ่งสำคัญที่สามารถบ่งชี้สุขภาพของลำไส้ ซึ่งควรมีลักษณะของวิลไลที่สูงนั้นสัมพันธ์กับการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ (Samanya and Yamauchi, 2002) ความลึกคริปต์น้อยและมีค่าอัตราส่วนความสูงวิลไลต่อความลึกคริปต์ที่มาก ในขณะที่วิลไลสั้น และความลึกคริปต์มาก บ่งบอกถึงสุขภาพที่ไม่ดีของลำไส้

ซึ่งนำไปสู่การดูดซึมสารอาหารที่ไม่มีประสิทธิภาพ การหลั่งสารต่าง ๆ ของระบบทางเดินอาหารที่เพิ่มขึ้น และการทำงานของลำไส้ลดลง (Xu et al., 2003)

โพรไบโอติกสามารถมีอิทธิพลทั้งในระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดและระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของโฮสต์ ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ภูมิคุ้มกันหลายชนิด เช่น granulocytes, dendritic cells, macrophages, T lymphocytes และ B lymphocytes ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการอักเสบถูกควบคุมโดยไซโตไคน์ (Hardy, et al. 2013) ซึ่งไซโตไคน์เป็นกลุ่มของโปรตีนขนาดเล็กที่ส่งผลต่อการส่งสัญญาณของเซลล์ไปยังเซลล์อื่น ๆ ที่สำคัญต่อการควบคุมระบบภูมิคุ้มกันและการตอบสนองต่อการอักเสบ (Incharoen et al., 2019; Tartrakoon et al., 2023) จากรายงานของ Evseev et al. (2019) กล่าวว่า T-cell ในเบอร์ซาของไก่ที่ติดเชื้อไวรัสสูกุกระตุ้นด้วยการแสดงออกของจำนวนของยีนไซโตไคน์เพิ่มขึ้น เช่น อินเตอร์ลิวคิน-6 (interleukin-6, IL-6) และอินเตอร์เฟอรอน-แกมมา (interferon- γ , IFN- γ) นอกจากนี้ Li et al. (2017) รายงานว่าการฉีดวัคซีน *S. gallolyticus* ในลูกเป็ดทำให้เกิด macrophage necroptosis ในม้ามโดยการติดเชื้อแบคทีเรียทำให้ระดับการแสดงออกของ mRNA *IL-6* เพิ่มขึ้น และเกิดความสัมพันธ์เชิงลบกับการเพิ่มขึ้นของ cytokine *IL-10* ที่ต้านการอักเสบ หรือระดับการแสดงออกของ *IL-10* ลดลงเมื่อเกิดการติดเชื้อ เช่นเดียวกับ Gu et al. (2012) ได้ศึกษาการติดเชื้อ Duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) ทำให้การปรับลดของ *IL-10* ลดลงในตับ อาจบ่งบอกถึงการอักเสบของตับเฉียบพลันและทำให้ลูกเป็ดตายอย่างรวดเร็วเพราะ *IL-10* เป็นหนึ่งของปัจจัยต้านการอักเสบหลัก ซึ่งสอดคล้องกับ Qin et al. 2019 ได้ศึกษาความแตกต่างระหว่างโรคฝ่าเท้าอักเสบ (foot pad dermatitis; FPD) และเปิดที่มีสุขภาพดีในเป็ดพ่อพันธุ์-แม่พันธุ์ พบว่าเป็ดพ่อพันธุ์-แม่พันธุ์ที่เป็นโรคฝ่าเท้าอักเสบมีระดับความเข้มข้นของไซโตไคน์ *IL-6* สูงกว่าเป็ดพ่อพันธุ์-แม่พันธุ์ที่มีสุขภาพดี นอกจากนี้ยังพบว่า TLR3 มีบทบาทสำคัญในการแสดงออกของไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ เช่น *IL-6* และ *IL-8* (Le et al., 2007) อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับการเสริมโพรไบโอติก *B. toyonensis* BCT-7112^T ในอาหารที่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ในเป็ดเนื้อ ซึ่งการศึกษานี้ได้ตรวจสอบว่าการเสริมโพรไบโอติก *B. toyonensis* BCT-7112^T ส่งผลต่อการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ในเป็ดเนื้อสายพันธุ์บาร์บารี แสดงให้เห็นว่าการเสริมด้วย *B. toyonensis* BCT-7112^T สามารถลดการแสดงออกของยีนไซโตไคน์ที่มีการอักเสบ เช่น *IFN- α* , *IFN- β* , *IL-6* และ *TLR3* ในเป็ดเนื้อได้

แบคทีเรียในไฟลัม Bacteroidetes และ Proteobacteria จัดเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีความสามารถในการย่อยคาร์โบไฮเดรต และผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยคาร์โบไฮเดรตจะช่วยกระตุ้นพัฒนาการของระบบภูมิคุ้มกัน และช่วยป้องกันการรุกรานของเชื้อโรค ส่วนในลำไส้เล็กส่วนปลายและลำไส้ใหญ่ของเป็ด พบว่ามีแบคทีเรีย Firmicutes, Proteobacteria และ

Bacteroidetes ไม่น้อยกว่าร้อยละ 80 (Vasai, F. 2014; Best, A.A. 2017; Wang, S. 2018; Chen, X. 2019) สามารถย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์สายยาวได้อย่างมีประสิทธิภาพ และปรับสภาพแวดล้อมในลำไส้ให้เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ จากรายงานของ Hernandez-Patlan et al. 2019 ยังพบว่าการเพิ่มจำนวนของ Proteobacteria เกิดการเปลี่ยนแปลงของ *Escherichia coli* 17 ในลำไส้ของเป็ดเนื้อสายพันธุ์เซอร์วิวัลเลย์ ตลอดการทดลอง 56 วัน เป็ดเนื้อที่ได้รับ *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับ 500 mg/kg และ 1000 mg/kg พบว่า Bacteroides เป็นแบคทีเรียเป็นหลักมีบทบาทสำคัญในการแยกโมเลกุลที่ซับซ้อนออกเป็นสารประกอบที่ง่าย ซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของโฮสต์ (Lan et al., 2006) และปรับปรุงสภาพแวดล้อมในลำไส้ ประโยชน์ของ Bacteroides สามารถย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์สายยาวได้อย่างมีประสิทธิภาพ และเกิดการเผาผลาญไดอะซิเตท โพรพิโอเนต ซักซิเนต (Line et al., 2010; Polansky et al., 2015)

นอกจากนี้ Prevotella เป็นเชื้อก่อโรคฉวยโอกาส ซึ่งในเป็ดเนื้อกลุ่มควบคุมมีปริมาณแบคทีเรีย Prevotella สูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด Wasti และคณะ (2021) รายงานว่า Christensenellaceae กับไก่เนื้อมีความสัมพันธ์กับยีนที่เกี่ยวข้องกับสารต้านอนุมูลอิสระ (Thioredoxin; TXN และ Nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2; NRF2) และกรดไขมันสายสั้น ซึ่งแบคทีเรียกลุ่ม Christensenellaceae ถือเป็นหนึ่งในลำดับที่สำคัญของลำไส้ โดยเฉพาะเป็ดเนื้อกลุ่ม *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 mg/kg เพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของ Christensenellaceae ในตัวอย่างไส้ติ่ง และจะหมดไปในสภาวะที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Mancabelli et al., 2017) นอกจากนี้ Fusobacterium ในเป็ดเนื้อที่ได้รับ *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับ 500 mg/kg พบว่าต่ำกว่าเป็ดเนื้อกลุ่มควบคุม Kollarcikova et al. (2019) รายงานว่า Fusobacterium ที่มากกว่าร้อยละ 5 มักจะเป็นตัวบ่งชี้การทำงานของลำไส้ที่ไม่เหมาะสม เป็นสาเหตุของการผลิตไข่ของไก่เนื้อสายพันธุ์ COBB ลดลง ดังนั้นจึงมีแนวโน้มว่าจะถูกฉวยโอกาสจากเชื้อก่อโรค แต่ในห่านและเป็ดป่าพบว่า Fusobacteria เป็นจุลินทรีย์หลักในลำไส้ (Wang et al., 2019) นอกจากนี้ยังพบสกุล Verrucomicrobia ซึ่งมีความสัมพันธ์กับสุขภาพของลำไส้ (Tan et al., 2019) ส่วนในกระเพาะพัก (crop) พบแบคทีเรีย Bacteroidetes และ Euryarchaeota ที่มีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการให้ผลผลิตสูง แต่ในทางตรงกันข้ามพบว่าแลคโตบาซิลลัสมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการผลิตที่ต่ำลง เช่น อัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น (Han et al., 2016) ดังนั้น *B. toyonensis* BCT-7112^T นี้จึงเป็นประโยชน์ต่อการทำงานของโฮสต์ และความอุดมสมบูรณ์ที่เพิ่มขึ้นในไส้ติ่งของเป็ดเนื้อ

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

- 1) เนื้อที่มีการเลี้ยงแบบโรงเรือนปิดมีระดับการแสดงออกของยีน *IFN- β* สูงกว่าเนื้อที่มีการเลี้ยงแบบโรงเรือนเปิด ส่วนเนื้อที่เลี้ยงแบบโรงเรือนเปิดมีระดับการแสดงออกของยีน *IFN- γ* และ *IL-10* สูงขึ้น แต่ระดับการแสดงออกของยีน *TLR3* ลดลง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างรูปแบบการเลี้ยงเนื้อและเนื้อที่ทั้ง 2 รูปแบบ พบว่ารูปแบบการเลี้ยงแบบปิดมีระดับการแสดงออกของยีน *IFN- γ* สูง และการแสดงออกของยีน *TLR3* ลดลง และรูปแบบการเลี้ยงเนื้อทั้ง 2 รูปแบบ ไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีน *IFN- α* , *IFN- β* , *IL-6*, *IL-10* และ *Mx*
- 2) จากการวิเคราะห์ α -diversity ในเนื้อและเนื้อที่ทั้ง 2 รูปแบบ แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการเลี้ยงแบบโรงเรือนเปิดมีค่า observed species และมีแบคทีเรียที่หลากหลายสูงกว่ารูปแบบการเลี้ยงแบบโรงเรือนปิด ในไส้ติ่งของเนื้อและเนื้อที่เลี้ยงในโรงเรือนเปิด จะพบไฟลัม Spirochaetes มากกว่า
- 3) การเสริมโปรไบโอติกในอาหารเนื้อเพื่อทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะ พบว่าประสิทธิภาพการเจริญเติบโตตลอดช่วงอายุของการทดลองไม่มีความแตกต่างจากเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม ยกเว้นสัปดาห์ที่ 3 เนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 mg/kg มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตต่อวันมากกว่าเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม สามารถบ่งชี้ได้ว่าเนื้อที่มีประสิทธิภาพการเจริญเติบโตโดยไม่จำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะ
- 4) ลักษณะซากของเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ไม่ส่งผลกระทบต่อร้อยละของซาก ร้อยละของหัวรวมคอ ร้อยละของปีก ร้อยละของอวัยวะภายใน ร้อยละของอก และร้อยละของสันใน แต่พบว่าเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 mg/kg มีร้อยละของเนื้อสะโพกสูงกว่าเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม
- 5) คุณภาพเนื้อของเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ไม่ส่งผลกระทบต่อค่า pH หลังฆ่า 45 นาที และ 24 ชั่วโมง รวมทั้งค่าสีต่าง ๆ ในเนื้อเปิด และความสามารถในการอุ้ม

น้ำของเนื้ออกในเปิดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับที่ 200 และ 500 mg/kg มีค่าการสูญเสียน้ำจากการละลายต่ำกว่าเปิดเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม

6) สันฐานวิทยาลำไส้เล็กของเปิดเนื้อทั้ง 3 ส่วน พบว่าอาหารที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T ไม่มีผลต่อความสูงของวิลลัส ความลึกของคริปต์ และสัดส่วนของความสูงของวิลลัสต่อความลึกของคริปต์ในลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนปลายของเปิดเนื้อ

7) ในช่วงอายุที่ 14 วัน ในเปิดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 และ 1000 mg/kg มีการแสดงออกของยีน *IL-6* ต่ำ และเปิดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 1000 mg/kg มีการแสดงออกของยีน *IFN- α* และ *IFN- β* มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับเปิดเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม ในช่วงอายุที่ 35 วัน เปิดเนื้อได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 mg/kg มีการแสดงออกของยีน *IFN- β* มีค่าลดลง ส่วนในกลุ่มเปิดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 1000 mg/kg มีการแสดงออกของยีน *Mx* ต่ำกว่าเปิดเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม สำหรับการแสดงออกของยีน *TLR3* ที่อายุ 56 วัน พบว่าเปิดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 1000 mg/kg มีการแสดงออกของยีน *TLR3* ต่ำกว่าเปิดเนื้อกลุ่มอาหารควบคุม ทำให้ระดับการแสดงออกของยีนกลุ่ม cytokines ในไส้ติ่งของเปิดเนื้อลดลง เนื่องจากการทำงานของโปรไบโอติกที่ช่วยปรับสมดุลแบคทีเรีย

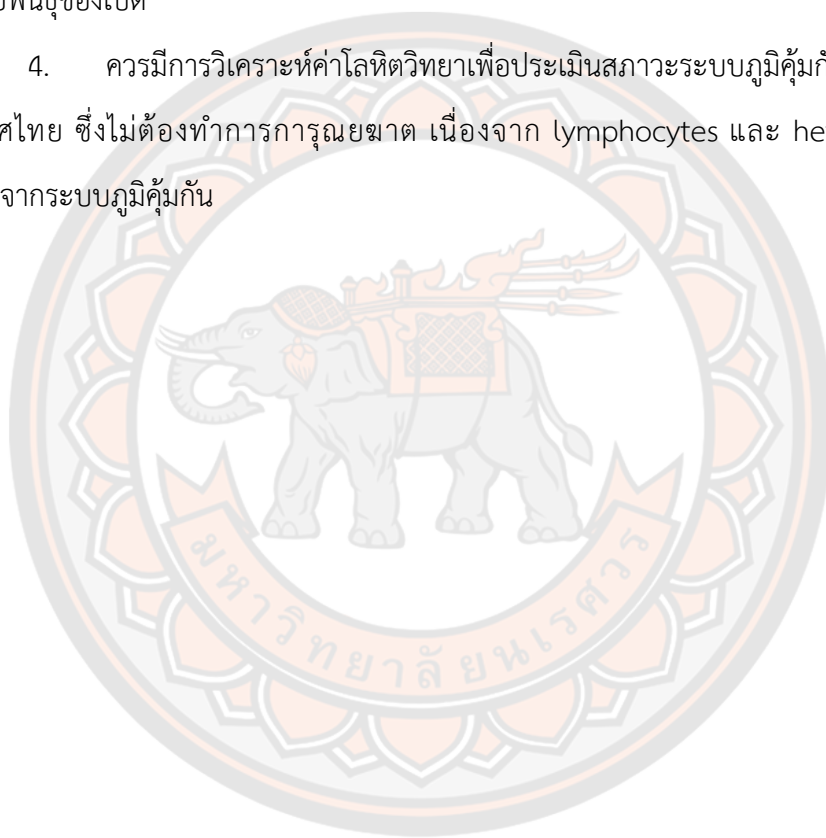
8) การจัดลำดับยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย สามารถจำแนก Operational Taxonomic Unit (OUT) ที่ระดับคล้ายคลึงกันร้อยละ ≥ 97 ส่งผลต่อสุขภาพและอัตราการเจริญเติบโตของเปิดเนื้อ พบว่าจากการวิเคราะห์ α -diversity ในดัชนีที่คำนวณได้แสดงให้เห็นว่าเปิดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 mg/kg มีค่า observed species, Chao1 และ ACE สูงกว่าเปิดเนื้อกลุ่มอื่น ๆ

9) แบคทีเรียในระดับไฟลัม Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Fusobacteria และ Deferribacteres เป็นไฟลัมหลัก 5 อันดับแรก ที่อยู่ในไส้ติ่งเปิดเนื้อที่ได้รับการเสริม *B. toyonensis* BCT-7112^T 500 และ 1000 mg/kg คิดเป็นร้อยละ 92.98 และ 97.28 ของความอุดมสมบูรณ์ทั้งหมด ตามลำดับ

10) ตลอดการทดลอง 56 วัน เปิดเนื้อที่ได้รับ *B. toyonensis* BCT-7112^T ในระดับ 500 mg/kg และ 1000 mg/kg พบว่า Bacteroides เป็นแบคทีเรียเป็นหลักมีบทบาทสำคัญในการแยกโมเลกุลที่ซับซ้อน ซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของโฮสต์

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเปรียบเทียบผลของการเสริมโพรไบโอติกกับยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ทดลอง
2. ควรมีข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้านความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจที่มีผลต่อการตัดสินใจ เช่น ราคาต้นทุน ราคาขาย และผลตอบแทน เป็นต้น
3. ควรมีการศึกษาผลของการเสริมโพรไบโอติกในระดับต่าง ๆ ให้เหมาะสมกับอายุ และสายพันธุ์ของเป็ด
4. ควรมีการวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยาเพื่อประเมินสภาวะระบบภูมิคุ้มกันในเป็ดที่เลี้ยงในประเทศไทย ซึ่งไม่ต้องทำการการุณยฆาต เนื่องจาก lymphocytes และ heterophil เป็นผลโดยตรงจากระบบภูมิคุ้มกัน



บรรณานุกรม



- คึกฤทธิ์ ศีลาสาย (2561). โพรไบโอติกที่ใช้ประโยชน์ในปศุสัตว์. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 36 (1), 152-160.
- มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี วีรชัย ชุมแสงโชติสกุล มาริษา นาวา อัญญา ปานทอง และวรางคณา กิจพิพิธ. (2564). ผลของอาหารสัตว์ฟังกซ์ขึ้นจากพรไบโอติกส์และซินไบโอติกส์ที่เสริมด้วยเศษหน่อไม้ฝรั่งตัดแต่งเหลือทิ้งต่อประสิทธิภาพการย่อยได้ของโภชนะกรดไขมันที่ระเหยง่าย จุลินทรีย์ในไส้ตัน และมิถุนวิทยาของลำไส้เล็กของไก่ไข่. เกษตร 49 ฉบับที่ 1: 241-257.
- ยูเรศ เรืองพานิช และพิเชษฐ ศรีบุญยงค์ (2562). ผลของการใช้โพรไบโอติก (GUT PRO) ต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโตและสัณฐานวิทยาของลำไส้ของไก่เนื้อ. สัตวแพทยมหานครสาร. 2562. 14(1): 23-32.
- ธัญธิดา นราแก้ว (2553). **คุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกของเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K4 และ K7 เพื่อเป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนม.** วิทยานิพนธ์วท.ม., สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.
- ศศิ วิมล. (2557). **ผลของสารเสริมชีวนะ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* ต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโต การย่อยได้ของสารอาหาร จำนวนจุลินทรีย์ในไส้ตันและสัณฐานวิทยาของลำไส้เล็กในไก่เนื้อ.** วิทยานิพนธ์ วท.ม., จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพมหานคร.
- อัจฉรา เพิ่ม (2549). **แบคทีเรียแลคติก. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา (หน้า 144).** โรงพิมพ์ภาพพิมพ์.
- Abd El-Hack, M.E., El-Saadony, M.T., Shafi, M.E., Qattan, S.Y.A., Batiha, G.E., Khafaga, A.F., Abdel-Moneim, A.E., Alagawany, M., 2020. Probiotics in poultry feed: A comprehensive review. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.) 104, 1835-1850.
- Abdel-Moneim, A.E., Selim, D.A., Basuony, H.A., Sabic, E.M., Saleh, A.A., Ebeid, T.A., 2020. Effect of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* spores on growth performance, oxidative status, and digestive enzyme activities in Japanese quail birds. Trop Anim Health Prod 52, 671-680.
- Abou-Kassem, D.E., Elsadek, M.F., Abdel-Moneim, A.E., Mahgoub, S.A., Elaraby, G.M., Taha, A.E., Elshafie, M.M., Alkhawtani, D.M., Abd El-Hack, M.E., Ashour, E.A., 2021. Growth, carcass characteristics, meat quality, and microbial aspects of growing quail fed diets enriched with two different types of probiotics

- (*Bacillus toyonensis* and *Bifidobacterium bifidum*). *Poultry Science* 100, 84-93.
- Abdulmawjood, A., J. Herrmann, S. Riede, G. Jimenez, A. Becker, and G. Breves. 2019. Evaluation of enterotoxin gene expression and enterotoxin production capacity of the probiotic strain *Bacillus toyonensis* BCT-7112T. *PLoS One* 14:e0214536. doi 10.1371/journal.pone.0214536.
- Afsharmanesh, M., Sadaghi, B., Silversides, F.G., 2013. Influence of supplementation of prebiotic, probiotic, and antibiotic to wet-fed wheat-based diets on growth, ileal nutrient digestibility, blood parameters, and gastrointestinal characteristics of broiler chickens. *Comparative Clinical Pathology* 22, 245-251.
- Akira, S. & Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*, 4: 499-511.
- Andersson, A. F., Lindberg, M., Jakobson, H., Backhed, F., Nyren, P. and Engstrand, L. (2008). Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS ONE* 3, e2836.
- Atela, J.A., Mlambo, V., Mnisi, C.M., 2019. A multi-strain probiotic administered via drinking water enhances feed conversion efficiency and meat quality traits in indigenous chickens. *Animal Nutrition* 5, 179-184.
- Arendt, M.K., Sand, J.M., Marcone, T.M., Cook, M.E., 2016. Interleukin-10 neutralizing antibody for detection of intestinal luminal levels and as a dietary additive in *Eimeria* challenged broiler chicks. *Poult. Sci.* 95, 430–438.
- Awad, W.A., Ghareeb, K., AbdelRaheem, S., Bohm J. (2009). Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poult Sci.* 88: 49-55.
- Batkowska, J., A. Brodacki, and G. Tomczyk. 2015. The Influence of Probiotic Bacteria (*Bacillus Toyoi*) on Livability and Performance of Young Meat-Type Turkeys. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 17:433-438. doi 10.1590/1516-635x1704433-438.
- Baum, B., E. M. Liebler-Tenorio, M. L. Enss, J. F. Pohlenz, and G. Breves. 2002. *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *Toyo*i influence the

- morphology and the mucins of the intestine of pigs. *Z Gastroenterol* 40:277-284. doi 10.1055/s-2002-30116.
- Blanch, A. R., J. Méndez, S. Castel, and M. Reina. 2014. Comparison of procedures for the extraction of supernatants and cytotoxicity tests in Vero cells, applied to assess the toxigenic potential of *Bacillus* spp. and *Lactobacillus* spp., intended for use as probiotic strains. *J. Microbiol. Meth.* 103:64-69. doi <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.05.019>.
- Best, A.A., Porter, A.L., Fraley, S.M. and Fraley, G.S. (2017). Characterization of Gut Microbiome Dynamics in Developing Pekin Ducks and Impact of Management System. *Front. Microbiol.* 4, 2125.
- Chamani, M. 2016. Efficacy of Bactocell® and Toyocerin® as probiotics on growth performance, blood parameters and intestinal morphometry of Turkey poults. *Iranian J. Appl. Anim. Sci.* 6:211-218.
- Charoensook, R., C. Knorr, B. Brenig, and G. Kesinee. 2013. Thai pigs and cattle production, genetic diversity of livestock and strategies for preserving animal genetic resources. *Maejo Int. J. Sci. Technol.* 7:113-132. doi 10.14456/mijst.2013.10.
- Chen, Y., Cheng, Y., Wen, C., Kang, Y., Wang, A. and Zhou, Y. (2018). Effects of dietary synbiotic supplementation as an alternative to antibiotic on the growth performance, carcass characteristics, meat quality, immunity, and oxidative status of Cherry Valley ducks. *Journal of Poultry Science*, 55(3), 182-189.
- Chen, X., Huang, L., Cheng, L., Hu, B., Liu, H., Hu, J., Hu, S., Han, C., He, H., Kang, B., Xu, H., Wang, J., Li, L., 2022. Effects of floor- and net-rearing systems on intestinal growth and microbial diversity in the ceca of ducks. *BMC Microbiol.* 22, 76.
- Chen, X.; Zheng, M.; Lin, F.; Cheng, X.; Xiao, S.; Chen, S.; Chen, S. Impacts of novel duck reovirus infection on the composition of intestinal microbiota of Muscovy ducklings. *Microb. Pathog.* 2019, 137, 103764.
- Chen, X., Zheng, M., Huang, M., Xiao, S., Lin, F., Chen, S., Chen, S., 2020. Muscovy Duck Reovirus Infection Disrupts the Composition of Intestinal Microbiota in Muscovy Ducklings. *Curr. Microbiol.* 77.

- Chen, X., B. Hu, L. Huang, L. Cheng, H. Liu, J. Hu, S. Hu, C. Han, H. He, B. kang, H. Xu, R. Zhang, J. Wang, and L. Li. 2021. The differences in intestinal growth and microorganisms between male and female ducks. *Poultry Science* 100:1167-1177. doi <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.10.051>.
- Choi JH, Kim GB, Cha CJ. Spatial heterogeneity and stability of bacterial community in the gastrointestinal tracts of broiler chickens. *Poult Sci.* 2014;93:1942–50.
- Choi KY, Lee TK, Sul WJ. Metagenomic analysis of chicken gut microbiota for improving metabolism and health of chickens — a review; 2015.
- Cogliani, C., H. Goossens and C. Greko. (2011). Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from europe. *Microbe.* 6(6): 274-279.
- Couper, K.N., Blount, D.G., Riley, E.M., 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.* 180, 5771e5777.
- Crow, M.K. (2003). Interferon-alpha: a new target for therapy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 48(9): 2396-2401.
- De Souza, L.F.A., D.N. Araujo, L.M. Stefani, I.C. Giometti, V.C. Cruz-Polycarpo, G. Polycarpo, and M.F. Burbarlelli. 2018. Probiotics on performance, intestinal morphology and carcass characteristics of broiler chickens raised with lower or higher environmental challenge. *Austral. J. Vet. Sci.* 50:35-41.
- Deepthi, B. V., R. Somashekaraiah, K. Poornachandra Rao, N. Deepa, N. K. Dharanisha, K. S. Girish, and M. Y. Sreenivasa. 2017. *Lactobacillus plantarum* MYS6 ameliorates fumonisin B1-induced hepatorenal damage in broilers. *Front. Microbiol.* 8:2317.
- Eldaghayes, I., L. Rothwell, A. Williams, D. Withers, S. Balu, F. Davison, and P. Kaiser. 2006. Infectious bursal disease virus: strains that differ in virulence differentially modulate the innate immune response to infection in the chicken bursa. *Viral Immunol.* 19:83-91. doi 10.1089/vim.2006.19.83.
- Erdogan Z, Erdogan S, Aslantas O, Çelik S. ORIGINAL ARTICLE: Effects of dietary supplementation of synbiotics and phytobiotics on performance, caecal coliform population and some oxidant/antioxidant parameters of broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2010;94:e40-e8.

- Erisir, Z., Poyraz, O., Onbasilar, E.E., Erdem, E., & Oksuztepe, G.A. (2009). Effects of housing system, swimming pool and slaughter age on duck performance, carcass and meat characteristics. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 8(9),1864-1869.
- Even, M., Davail, S., Rey, M., Tavernier, A., Houssier, M., Bernadet, M. D., Gontier, K., Pascal, G. and Ricaud, K. (2018). Probiotics strains modulate gut microbiota and lipid metabolism in mule ducks. *The Open Microbiology Journal*. 12, 71–93.
- Evseev D, Magor KE. Innate Immune Responses to Avian Influenza Viruses in Ducks and Chickens. *Vet Sci* 2019;6.
- FAO, (2016). Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation. FAO Animal production and health paper no. 179. Rome, Italy. <http://www.fao.org/3/a-i5933e.pdf>. (accessed 3 September 2019).
- Fernández, M., Juan, A.Q, Martín J, Herrero, M., Pardo, M., Michel, AH. and Vicente, C. (1999). In vivo and in vitro induction of MxA protein in peripheral blood mononuclear cells from patients chronically infected with hepatitis C virus. *J Infect Dis* 180:262–267.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5): 365–378.
- Gisbert, E., M. Castillo, A. Skalli, K. B. Andree, and I. Badiola. 2013. *Bacillus cereus* var. *toyoi* promotes growth, affects the histological organization and microbiota of the intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. *Journal of Animal Science* 91:2766-2774. doi 10.2527/jas.2012-5414
- Glenwright, H., S. Pohl, F. Navarro, E. Miro, G. Jiménez, A. R. Blanch, and C. R. Harwood. 2016. The Identification of intrinsic chloramphenicol and tetracycline resistance genes in members of the *Bacillus cereus* Group (sensu lato). *Front. Microbiol.* 7:2122. doi 10.3389/fmicb.2016.02122.
- Godfrey KM, Reynolds RM, Prescott SL, Nyirenda M, Jaddoe VW, Eriksson JG, et al. Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2017;5:53.

- Guo, M., G. Hao, B. Wang, N. Li, R. Li, L. Wei, and T. Chai. 2016. Dietary administration of *Bacillus subtilis* enhances growth performance, immune response and disease resistance in cherry valley ducks. *Front. Microbiol.* 7.
- Gunal, M, G. Yayli, O. Kaya, N. Karahan, O. Sulak. 2006. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. *Int. J. Poult. Sci.* 5: 149-155.
- Haller, O., Kochs, G., Weber, F., 2007. Interferon, Mx, and viral countermeasures. *Cytokine Growth Factor Rev.* 5–6, 425–433.
- Hampson, D. J. and Stephens, C. P. (2002). Control of Intestinal Spirochaete Infections in Chickens. Rural Industries Research and Development Corporation. <https://www.agrifutures.com.au/wp-content/uploads/publications/02-087.pdf>
- Han, G. G., E. B. Kim, J. Lee, J. Y. Lee, G. Jin, J. Park, C. S. Huh, I. K. Kwon, D. Y. Kil, Y. J. Choi, and C. Kong. 2016. Relationship between the microbiota in different sections of the gastrointestinal tract, and the body weight of broiler chickens. *Springerplus* 5:911. doi 10.1186/s40064-016-2604-8.
- Hong, H. A., H. Duc le, and S. M. Cutting. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:813-835. doi 10.1016/j.femsre.2004.12.001.
- Hardy, H., Harris, J., Lyon, E., Beal, J., & Foey, A. D. (2013). Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: Homeostasis and immunopathology. *Nutrients.* <https://doi.org/10.3390/nu5061869>.
- Hernandez-Patlan D, Solis-Cruz B, Pontin KP, Hernandez-Velasco X, Merino-Guzman R, Adhikari B, et al. Impact of a *Bacillus* direct-fed microbial on growth performance, intestinal barrier integrity, necrotic enteritis lesions, and ileal microbiota in broiler chickens using a laboratory challenge model. *Frontiers in veterinary science.* 2019;6:108.
- Jennifer, H. C., G. K. Michael, C. Ceren, K. Pete, and J. L. Susan. (2007). Breed effect on early cytokine mRNA expression in spleen and cecum of chickens with and without *Salmonella enteritidis* infection. *Developmental and Comparative Immunology* 31: 52–60.

- Jennifer, T. B., G. Joshua, P. Payvand, and S. Shayan. (2010). Effects of lactobacilli on cytokine expression by chicken spleen and cecal tonsil cells. *Clinical and Vaccine Immunology*. Vol. 7(9): 1337–1343.
- Jiao, P., Wei, L., Cheng, Y.Q., Yuan, R., Han, F., Liang, J., Liu, W., Ren, T., Xin, C. and Liao, M.J.P.S. (2012). Molecular cloning, characterization, and expression analysis of the Muscovy duck Toll-like receptor 3 (MdTLR3) gene. *Poultry Science*, 91: 2475-2481.
- Gaggia, F., Mattarelli, P. and Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology* 141, S15–S28.
- Gu C. Q. C. Q. XieX. Y. HuW. P. ZhangD. R. BiG. F. Cheng. (2012). Cytokine gene expression in the livers of ducklings infected with duck hepatitis virus-1 JX strain. *Poultry Science* 91 :583–591.
- Gu, T., Li, G., Wu, X., Zeng, T., Xu, Q., Li, L., Vladyslav, S., Chen, G. and Lu, L. (2020). Pattern-recognition receptors in duck (*Anas platyrhynchos*): identification, expression and function analysis of toll-like receptor 3. *British Poultry Science*, 62(3); 346-352.
- Guo, M., Hao, G., Wang, B., Li, N., Li, R., Wei, L. and Chai, T. (2016). Dietary Administration of *Bacillus subtilis* Enhances Growth Performance, Immune Response and Disease Resistance in Cherry Valley Ducks. *Frontiers in Microbiology* 7(1975), 1-9.
- Guo, Y., Wang, Y., Liu, Z., Guo, X., Deng, Y., Ouyang, Q., Liu, H., Hu, S., Hu, B., Li, L., He, H., Xia, L., Zhang, R. and Wang, J. (2021). Effects of rearing systems on production performance, antioxidant capacity and immune status of meat ducks at different ages. *Animal* 15,100199.
- Han, G.G., Kim, E.B., Lee, J., Lee, J.Y., Jin, G., Park, J., Huh, C.S., Kwon, I.K., Kil, D.Y., Choi, Y.J., Kong, C., 2016. Relationship between the microbiota in different sections of the gastrointestinal tract, and the body weight of broiler chickens. *Springerplus* 5, 911.

- Harimurti, S. and Hadisaputro, W. (2015). Probiotics in poultry. *Beneficial Microorganisms in Agriculture, Aquaculture and Other Areas*. Vol. 29, Springer.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 11(8), 506-514.
- Huang, Z., Mu, C., Chen, Y., Zhu, Z., Chen, C., Lan, L., Chen, G. (2015). Effects of dietary probiotic supplementation on LXR α and CYP7 α 1 gene expression, liver enzyme activities and fat metabolism in ducks. *British Poultry Science*, 56(2), 218-224.
- Incharoen, T., Charoensook, R., Onoda, S., Tartrakoon, W., Numthuam, S., Pechkong, T., 2019. The effects of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 supplementation on growth performance, intestinal morphology, and immune-related gene expression in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 257, 114272.
- Jadamus, A. W. Vahjen, and I. Kühn. 2000a. The effects of the probiotic Toyocerin in fattening poultry. *Lohmann Information*. No. 23, page 3.
- Jadamus, A., W. Vahjen, and O. Simon. 2000b. Influence of the probiotic bacterial strain, *Bacillus cereus* var. *toyoi*, on the development of selected microbial groups adhering to intestinal mucosal tissues of piglets. *Journal of Animal and Feed Sciences* 9:347-362. doi 10.22358/jafs/68052/2000.
- Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A.R., Tamames, J., Kämpfer, P., Kolstø, A.B., Ramón, D., Martínez, J.F., Codoñer, F.M., Rosselló-Móra, R., 2013. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Syst Appl Microbiol* 36, 383-391.
- Khajareem, J. and C. Ratanasethakul. 1998. Probiotics in breeder feed. *World Poult.*, 14: 18-19.

- Kantas, D., Papatsiros, V., Tassis, P., Giavasis, I., Bouki, P., Tzika, E., 2014. A feed additive containing *Bacillus toyonensis* (Toyocerin (R)) protects against enteric pathogens in postweaning piglets. *Journal of Applied Microbiology* 118.
- Khonyoung, D., Yamauchi, K.-e., 2012. Effects of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 on morphology of intestinal villi and epithelial cells in broiler chickens. *J Appl Anim Res* 40, 140-147.
- Kollarcikova, M., Kubasova, T., Karasova, D., Crhanova, M., Cejkova, D., Sisak, F., Rychlik, I., 2019. Use of 16S rRNA gene sequencing for prediction of new opportunistic pathogens in chicken ileal and cecal microbiota. *Poultry Science* 98, 2347-2353.
- Kareem, K. Y., T. C. Loh, H. L. Foo, H. Akit. and A. A. Samsudin. (2016). Effect of dietary probiotic and inulin on growth performance, *IGF-1* and *GHR* mRNA expression, faecal microbiota and volatile fatty acid in broilers. *BMC Veterinary Research*. 1-10.
- Lalani, I., K. Bhol, and A. R. Ahmed. (1997). Interleukin-10: Biology, role in inflammation, and autoimmunity. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 79:469–483.
- Lan, P.T.N., Sakamoto, M., Sakata, S., Benno, Y., 2006. *Bacteroides barnesiae* sp. nov., *Bacteroides salanitronis* sp. nov. and *Bacteroides gallinarum* sp. nov., isolated from chicken caecum. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 2853-2859.
- Lee, Y., Kim, W. H., Lee, S., Lillehoj, H. S. (2018). Detection of chicken interleukin-10 production in intestinal epithelial cells and necrotic enteritis induced by *Clostridium perfringens* using capture ELISA. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 204:52–58.
- Leser, T.D., Mølbak, L., 2009. Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environ Microbiol* 11, 2194-2206.
- Li, M., Liu, B., Gu, C., Zhang, W., Yang, J., Cheng, G., Liu, C. and Hu, X. (2017). Necroptosis of Splenic Macrophages Induced by *Streptococcus gallolyticus* subsp. *Pasteurianus*. *Avian Dis.* 61(1):115-122. doi: 10.1637/11449-061216-Reg.

- Li, C., Wang, J., Zhang, H., Wu, S., Hui, Q., Yang, C., Fang, R. and Qi, G. (2019). Intestinal Morphologic and Microbiota Responses to Dietary *Bacillus* spp. in a Broiler Chicken Model. *Frontiers in Physiology*, 9(1968), 1-18.
- Li, S. Y. 2014. Effects of the scale raises on health and welfare of broilers. *China Poul* 36:2–5.
- Lilly, D.M. and R.H. Stillwell. (1965). Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms, pp. 747-748.
- Line, J.E., Hiett, K.L., Guard-Bouldin, J., Seal, B.S., 2010. Differential carbon source utilization by *Campylobacter jejuni* 11168 in response to growth temperature variation. *J Microbiol Methods* 80, 198-202.
- Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F. D. and Knight, R. (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res.* 35, e120.
- Lodemann, U., B. Lorenz, K. Weyrauch, and H. Martens. 2008. Effects of *Bacillus cereus* var. *Toyoi* as probiotic feed supplement on intestinal transport and barrier function in piglets. *Archives of Animal Nutrition* 62:87-106. doi 10.1080/17450390801912068.
- Lokapinasari, W.P., Agustono, B., Arif, M.A.A., Maslachah, L., Chandra, E.H. and Yulianto, A.B. (2022). Effect of probiotic and *Moringa oleifera* extract on performance, carcass yield, and mortality of Peking duck. *Vet World*. 2022 Mar; 15(3): 694–700.
- Lutful Kabir, S.M., 2009. The role of probiotics in the poultry industry. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 3531-3546.
- Mancabelli, L., Milani, C., Lugli, G.A., Turrone, F., Cocconi, D., van Sinderen, D., Ventura, M., 2017. Identification of universal gut microbial biomarkers of common human intestinal diseases by meta-analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 93.
- Männer, K. 2012. Efficacy of *Bacillus cereus* var. *toyoi* on performance, faecal microflora and immune response in rearing calves. 5th European Spores Conference Proceedings (Abstracts for oral presentations) - Royal Holloway University of London, p. 26.

- Mao, Q., Y. Sun, and C. Wang. 2018. Diversity analysis of luminal and mucosa-associated microbial communities in obese mice. *Zhonghua nei ke za zhi* 57:743-748. doi 10.3760/cma.j.issn.0578-1426.2018.10.009.
- Mast, J., Goddeeris, B.M., 1999. Development of immunocompetence of broiler chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 70, 245-256.
- Medzhitov, R., and C. J. Janeway. 2000. Advances in immunology: Innate immunity. *New Engl. J. Med.* 343:338–344.
- Mingmongkolchai, S., and W. Panbangred. 2018. Bacillus probiotics: An alternative to antibiotics for livestock production. *Journal of applied microbiology* 124. doi 10.1111/jam.13690.
- Mountzouris, K.C., P. Tsirtsikos, I. Palamidi, A. Arvaniti, M. Mohnl, G. Schatzmayr, K. Fegeros. 2010. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and caecal microflora composition. *Poult. Sci.* 89: 58-67.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A., 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 683e765.
- Moreira de S, D., S. S. Medeiros, L. Leivas, F. P. Romano, L. A. Wasielesky, B. W. Cupertino, and E. L. 2011. The use of probiotics during the nursery rearing of the pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817) in a zero-exchange system. *Aquaculture Research*, 1-10.
- Murphy, K. M., and S. L. Reiner. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2:933–944.
- Naumova, N.B., Alikina, T.Y., Zolotova, N.S., Konev, A.V., Pleshakova, V.I., Lescheva, N.A., Kabilov, M.R., 2021. Bacillus-Based Probiotic Treatment Modified Bacteriobiome Diversity in Duck Feces. *Agriculture* 11, 406.
- Neospark. (2007). Antibiotic growth promoters in animal production. (Online). Available: <https://pdfs.semanticscholar.org/c47d/b4a42441e89f831d5c713583ff9c4ee3bdb5.pdf> (August 2, 2019).

- Onrust L, Ducatelle R, Driessche KV, Maesschalck CD, Vermeulen K, Haesebrouck F, et al. Steering endogenous butyrate production in the intestinal tract of broilers as a tool to improve gut health. *Front Vet Sci.* 2015;2:75.
- Parker, R. B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health.* 29(4), 4-8.
- Pinheiro, V., J. Mourão. and G. Jiménez, 2007. Influence of Toyocerin® (*Bacillus cereus* var. *Toyoi*) on breeding performance of primiparous rabbit does. *World Rabbit Science* 15. 178-188. doi 10.4995/wrs.2007.590.
- Polansky, O., Sekelova, Z., Faldynova, M., Sebkova, A., Sisak, F., Rychlik, I., 2015. Important Metabolic Pathways and Biological Processes Expressed by Chicken Cecal Microbiota. *Appl Environ Microbiol* 82, 1569-1576.
- Qin, S.M., Bai, W.Q., Zhang, K.Y., Ding, X.M., Bai, S.P., Wang, J.P., Peng, H.W., Yang, Y.F., Chen, C., Zeng, Q.F., 2019. Different microbiomes are found in healthy breeder ducks and those with foot pad dermatitis. *Poultry Science* 98, 6340-6348.
- Rodrigue, S., Materna, A.C., Timberlake, S.C., Blackburn, M.C., Malmstrom, R.R., Alm, E.J. and Chisholm, S.W. (2010). Unlocking short read sequencing for metagenomics. *PLoS One* 5(7), e11840 (1-9)
- Roos, T.B., de Moraes, C.M., Sturbelle, R.T., Dummer, L.A., Fischer, G., Leite, F.P.L., 2018. Probiotics *Bacillus toyonensis* and *Saccharomyces boulardii* improve the vaccine immune response to Bovine herpesvirus type 5 in sheep. *Res Vet Sci* 117, 260-265.
- Rothwell, L., J. R. Young, R. Zoorob, C. A. Whittaker, P. Hesketh, A. Archer, A. L. Smith, and P. Kaiser. 2004. Cloning and characterization of chicken IL-10 and its role in the immune response to *Eimeria maxima*. *J. Immunol.* 173:2675–2682.
- Rychlik, I., 2020. Composition and Function of Chicken Gut Microbiota. *Animals (Basel)* 10.
- Sahin, E.H. and Yadimci, M. (2009). Effect of kefir as a probiotic on growth performance and carcass characteristics in geese (*Anser anser*). *Journal of animal and veterinary advances.* 8(3); 562-567.

- Samanya, M. and Yamauchi, K.E., 2002. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. natto. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.*, 133: 95-104.
- Saraiva, M., O'Garra, A., 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews. Immunology* 10, 170-181.
- Sarang, N.R., Babu, L.K., Kumar, A., Pradhan, C.R., Pati, P.K., Mishra, J.P., 2016. Effect of dietary supplementation of prebiotic, probiotic, and synbiotic on growth performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Vet World* 9, 313-319.
- Starcevic, M., H. Mahmutovic, N. Glamoclija, M. Basic, R. Andjelkovic, R. Mitrovic, R. Markovic, J. Janjic, M. Boskovic. and M.Z. Baltic. 2021. Growth performance, carcass characteristics, and selected meat quality traits of two strains of Pekin duck reared in intensive vs semi-intensive housing systems. *Animal* 15:100087.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S., 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 878-888.
- Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi, and A. H. David. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol* 75:163-189.
- Shargh, M., Dastar, B., Zerehdaran, S., Khomeiri, M., Moradi, A., 2012. Effects of using plant extracts and a probiotic on performance, intestinal morphology, and microflora population in broilers. *The Journal of Applied Poultry Research* 21, 201-208.
- Shang, Y., Kumar, S., Oakley, B., & Kim, W. K. (2018). Chicken Gut Microbiota: Importance and Detection Technology. *Front Vet Sci*, 5, 254.
- Shargh, M., Dastar, B., Zerehdaran, S., Khomeiri, M., Moradi, A., 2012. Effects of using plant extracts and a probiotic on performance, intestinal morphology, and microflora population in broilers. *The Journal of Applied Poultry Research* 21, 201-208.

- Singh KM, Deshpande S, Jakhesara SJ, Koringa PG, Rank DN, Joshi CG. High throughput 16S rRNA gene-based pyrosequencing analysis of the fecal microbiota of high FCR and low FCR broiler growers. *Mol Biol Rep.* 2012; 39:10595–602.
- Soumeh EA, Cedeno A, Niknafs S, Bromfield J, Hoffman LC. The Efficiency of Probiotics Administrated via Different Routes and Doses in Enhancing Production Performance, Meat Quality, Gut Morphology, and Microbial Profile of Broiler Chickens. *Animals (Basel)* 2021;11.
- Stanley D, Hughes RJ, Moore RJ. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98:4301–10.
- Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. (2003) Toll-Like Receptor. *Annual Review of Immunology*, 21:335-376.
- Tan, Z., Luo, L., Wang, X., Wen, Q., Zhou, L., Wu, K., 2019. Characterization of the cecal microbiome composition of Wenchang chickens before and after fattening. *PLoS One* 14, e0225692.
- Trapezar, M., T. Leouffre, M. Faure, H. E. Jensen, P. E. Granum, A. Cencic, and S. P. Hardy. 2011. The use of a porcine intestinal cell model system for evaluating the food safety risk of *Bacillus cereus* probiotics and the implications for assessing enterotoxigenicity. *Apmis.* 119:877-884. doi 10.1111/j.1600-0463.2011.02797.x.
- Tartrakoon, W., R.Charoensook, T. Incharoen, S.Numthuam, T. Pechrkong, S.Onoda, G.Shoji, B.Brenig. 2023. Effects of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 supplementation on growth performance, blood profiles, intestinal morphology, and immune gene expression in pigs. *Vet. Sci.* 10: 87.
- Vanbelle M., E. Teller and M. Focant, (1990). Probiotics in animal nutrition: a review. *Arch. Animal Nutrition*, 40, 543–556.
- Vasai, F., Ricaud, K. B., Cauquil, L., Daniel, P., Peillod, C., Gontier, K., Tizaoui, A., Bouchez, O., Combes, S. and Davail, S. (2014). *Lactobacillus sakei* modulates mule duck microbiota in ileum and ceca during overfeeding. *Poultry Science* 93, 916–925.

- Vilà, B., A. Fontgibell, I. Badiola, E. Esteve-Garcia, G. Jiménez, M. Castillo, and J. Brufau. 2009. Reduction of *Salmonella enterica* var. *Enteritidis* colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. *toyoi* inclusion in poultry feeds. *Poult. Sci.* 88:975-979.
- Vineetha, P. G., S. Tomar, V. K. Saxena, M. Kapgate, A. Suvarna, and K. Adil. 2017. Effect of laboratory-isolated *Lactobacillus plantarum* LGFCP4 from gastrointestinal tract of guinea fowl on growth performance, carcass traits, intestinal histomorphometry 10 AN ET AL. and gastrointestinal microflora population in broiler chicken. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 101:e362–e370.
- Wang, L., G. Fu, S. Liu, L. Li, and X. Zhao. 2019. Effects of oxygen levels and a *Lactobacillus plantarum* strain on mortality and immune response of chickens at high altitude. *Sci. Rep.* 9:16037.
- Wang, S.; Chen, L.; He, M.; Shen, J.; Li, G.; Tao, Z.; Wu, R.; Lu, L. 2018. Different rearing conditions alter gut microbiota composition and host physiology in Shaoxing ducks. *Sci. Rep.* 2018, 8, 7387.
- Wang, W., Zheng, S., Li, L., Yang, Y., Liu, Y., Wang, A., Sharshov, K., Li, Y., 2019. Comparative metagenomics of the gut microbiota in wild greylag geese (*Anser anser*) and ruddy shelducks (*Tadorna ferruginea*). *Microbiologyopen* 8, e00725.
- Wasti, S., Sah, N., Singh, A.K., Lee, C.N., Jha, R., Mishra, B., 2021. Dietary supplementation of dried plum: a novel strategy to mitigate heat stress in broiler chickens. *J Anim Sci Biotechnol* 12, 58.
- Weimer PJ. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: implications for engineering improved ruminal fermentations. *Front Microbiol.* 2014; 6:296.
- Williams, L.D., Burdock, G.A., Jiménez, G., Castillo, M., 2009. Literature review on the safety of Toyocerin, a non-toxicogenic and non-pathogenic *Bacillus cereus* var. *toyoi* preparation. *Regul Toxicol Pharmacol* 55, 236-246.

- Xiao, D., Y. Wang, G. Liu, J. He, and W. Qiu. (2014). Effects of chitosan on intestinal inflammation in weaned pigs challenged by enterotoxigenic escherichia coli. PLoS ONE, 9(8), e104192.
- Xu, Z., Hu, C., Xia, M., Zhan, X. and Wang, M. 2003. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. Poult. Sci., 82: 1030-1036.
- Yadav, S. and Jha, R. (2019). Strategies to modulate the intestinal microbiota and their effects on nutrient utilization, performance, and health of poultry. J Anim Sci Biotechnol, 10(2), 1-11.
- Zhang, L., Zhang, L., Zhan, X., Zeng, X., Zhou, L., Cao, G., Chen, A., Yang, C., 2016. Effects of dietary supplementation of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune response, intestinal barrier function, and digestive enzyme activity in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. J Anim Sci Biotechnol 7, 3.
- Zhang, M., Song, K., Li, C., Chen, Z., Ding, C. and Liu, G. (2015). Molecular cloning of Peking duck Toll-like receptor 3 (duTLR3) gene and its responses to reovirus infection. Virology Journal, 12:207, 1-8.
- Zhengdong, Z., C.W. Richard and E.F. George. (2002). Identification of characteristic oligonucleotides in bacterial 16S ribosomal RNA sequence dataset. Bioinformatics. 18 (3), 244-250.
- Zhao, Y., Li, X., Sun, S., Chen, L., Jin, J., Liu, S., Song, X., Wu, C., Lu, L., 2019. Protective role of dryland rearing on netting floors against mortality through gut microbiota-associated immune performance in Shaoxing ducks. Poult Sci 98, 4530-4538.
- Zurmiati, Wizna, Abbas MH, Mahata ME, Fauzano R. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic on growth performance parameters of pitalah ducks. International Journal of Poultry Science 2017;16:147-53



ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยนครพนม

ภาคผนวก ก การเตรียมสาร

1. การเตรียมสารละลาย 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ชั่ง SDS 10 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง 25-30 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสารละลาย Ethanol ความเข้มข้นร้อยละ 80

ปิเปตเอทานอลเข้มข้นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ลงในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ

3. การเตรียมสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) 10 × (pH 7.4)

NaCl	80	กรัม
KCl	2	กรัม
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	14.4	กรัม
KH ₂ PO ₄	2.4	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 800 ml ปรับ pH 7.4 ด้วย 1N NaOH หรือ HCL ความเข้มข้นร้อยละ 20 เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมสารละลาย 1×TAE

โดยใช้กระบอกตวงเตรียมสารละลาย 50×TAE ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ละลายกับน้ำกลั่น ปริมาตร 960 มิลลิลิตร

5. การเตรียมสารละลาย Tissue lysis buffer

Tris-Cl (1 M, H 8.0-8.5)	2.0	ml
NaCl (5 M)	0.8	ml
SDS (10% in sterile H ₂ O)	0.4	ml
EDTA (0.5 M)	0.2	ml
Proteinase K	2.0	mg
ddH ₂ O/DEPC water	14.6	ml
Total	20	ml

เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้งาน

6. การเตรียมไพรเมอร์

ปิเปต 10 pmol Primer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ใน tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และปิเปต ddH₂O ปริมาตร 90 ไมโครลิตร

7. การปรับปริมาตรดีเอ็นเอให้เป็น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

ปิเปตดีเอ็นเอเข้มข้นปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงใน Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และปิเปต ddH₂O ปริมาตร 45 ไมโครลิตร

8. วิธีการเตรียม Agarose ความเข้มข้นร้อยละ 2

1. ชั่ง Agarose ปริมาณ 2 กรัม แล้วเทลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติม 1xTAE Buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีผง Agarose เขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปใส่เครื่องไมโครเวฟ ตั้งอุณหภูมิความร้อนสูงสุด ตั้งเวลาประมาณ 3 นาที หรือจนกระทั่งผง Agarose ละลายเข้ากับบัพเฟอร์จนเป็นลักษณะเหลวใส
4. นำ Agarose ที่มีลักษณะเหลวใสไปหล่อน้ำเพื่อให้อุณหภูมิภายในลดลง แต่ไม่ถึงกับแข็งตัวเพื่อลดการเสื่อมของแท่ง
5. ปิเปต SafeView™ Nucleic Acid Stain ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในขวดที่มี Agarose เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน
6. วาง Gel chamber บนโต๊ะ เลือก comb ที่เหมาะสม พร้อมปรับระดับให้เสมอกับพื้นโต๊ะ
7. นำ Agarose ไปเทลงใน gel chamber ให้ทั่วถาด รอให้เจลแข็งตัวประมาณ 15 นาที
8. เมื่ออุ่นแข็งตัวแล้วดึง comb ออก ยกถาดเจลออกจาก gel chamber

9. การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของไพรเมอร์

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของ Complementary DNA (cDNA) ด้วยวิธี Gradient PCR เป็นการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยการตั้งอุณหภูมิในช่วงใดขึ้นอยู่กับ Primers นั้น ๆ เป็นเทคนิคใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดของ annealing (Optimal annealing temperature) สำหรับ primers โดยใช้ขั้นตอนน้อยที่สุด โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

1. Initial denature	95	องศาเซลเซียส	3-5	นาที	
2. Denaturing	95	องศาเซลเซียส	20 - 40	วินาที	} x 28-34 รอบ
3. Annealing	50 - 70	องศาเซลเซียส	30-60	วินาที	
4. Extension	72	องศาเซลเซียส	40 วินาที - 4	นาที	
5. Final Extension	72	องศาเซลเซียส	5 - 10	นาที	
6. Final extension	4	องศาเซลเซียส	∞		

ตรวจสอบและเปรียบเทียบความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอด้วย Agarose ความเข้มข้นร้อยละ 2 ด้วยเจลอิเล็กโตโฟเรซิสที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ โดยดูจากแถบแบนที่มีความเข้มข้นชัดเจนที่สุด

ภาคผนวก ข รูปแบบโรงเรือน และการเตรียมโรงเรือน



Figure 27 โรงเรือนเป็ดไข่แบบเปิด (ภาพบน) เก็บตัวอย่างม้ามในเป็ดไข่ (ภาพล่าง)



Figure 28 โรงเรือนเป็ดเนื้อแบบเปิด (ภาพบน) เก็บตัวอย่างม้ามและไส้ติ่งในเป็ดเนื้อ (ภาพล่าง)

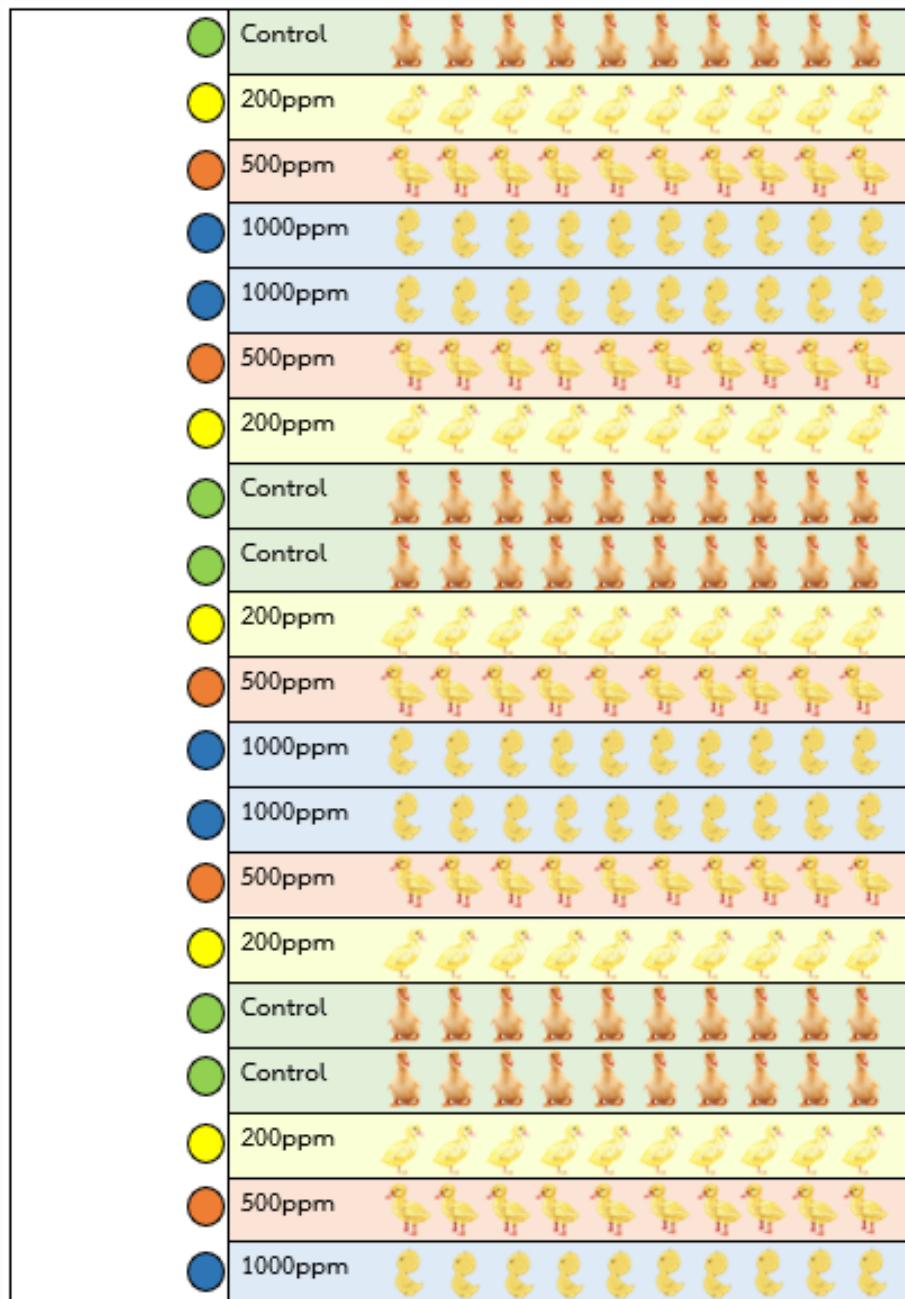


Figure 29 แผนผังการทดลองในโรงเรือน



Figure 30 ทำความสะอาด ข่อมโรงเรือน และเตรียมโรงเรือน



Figure 31 ฟันยาฆ่าเชื้อโรงเรือนเตรียมไฟก่อกูกเปิด (ภาพบน) เซ็นเซอร์วัดอุณหภูมิและความชื้น (ภาพกลาง) ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (ภาพล่าง)

ภาคผนวก ค การเลี้ยงการจัดการเปิดเนื้อทุก ๆ สัปดาห์



Figure 32 ติดเบอร์ขา (ภาพบน) ชั่งน้ำหนัก (ภาพกลาง) เตรียมน้ำและอาหารลูกเป็ดอายุ 1 วัน (ภาพล่าง)

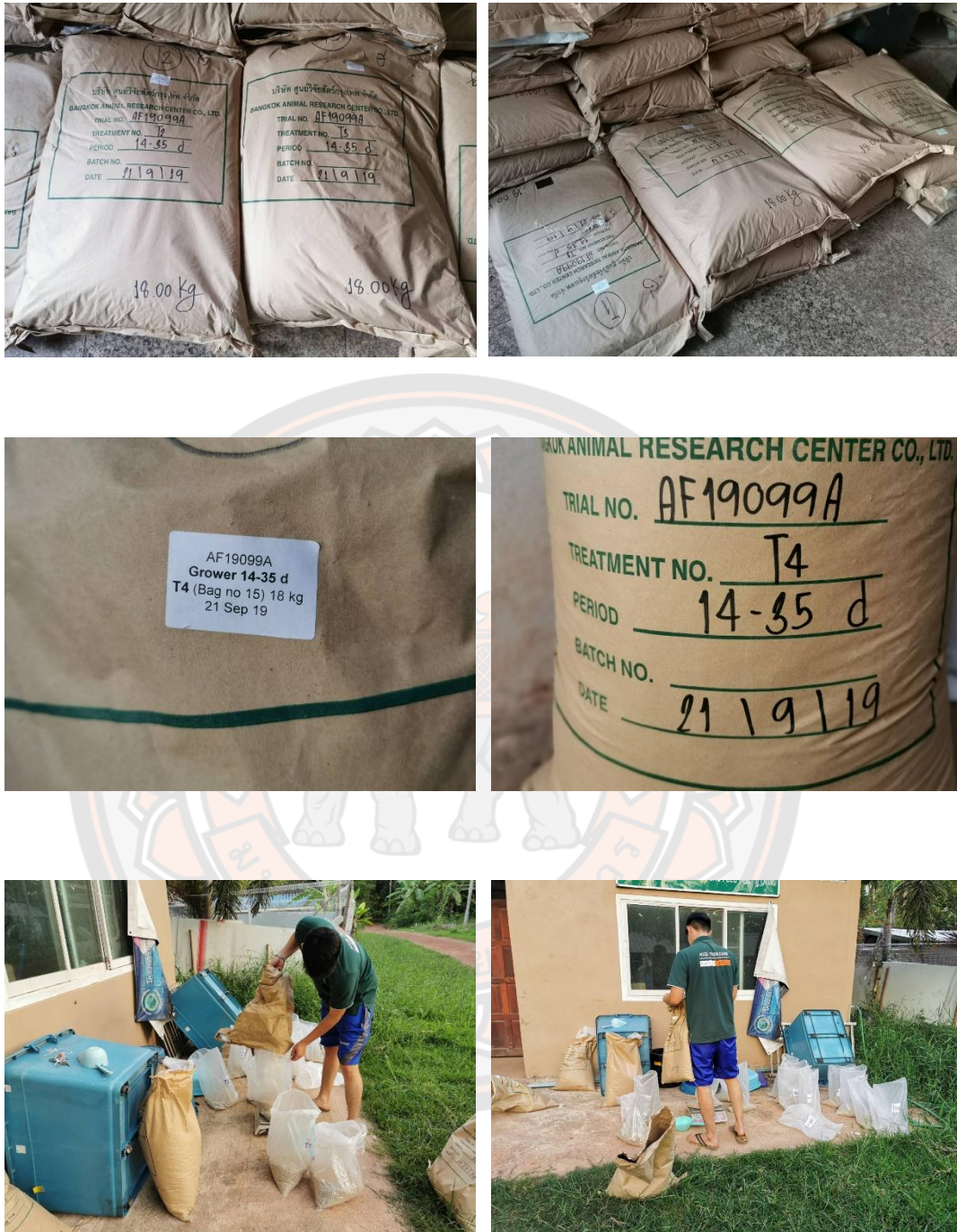


Figure 33 อาหารเปิดเนื้อระยะต่าง ๆ และช่องอาหารเปิดเนื้อทุก ๆ สัปดาห์

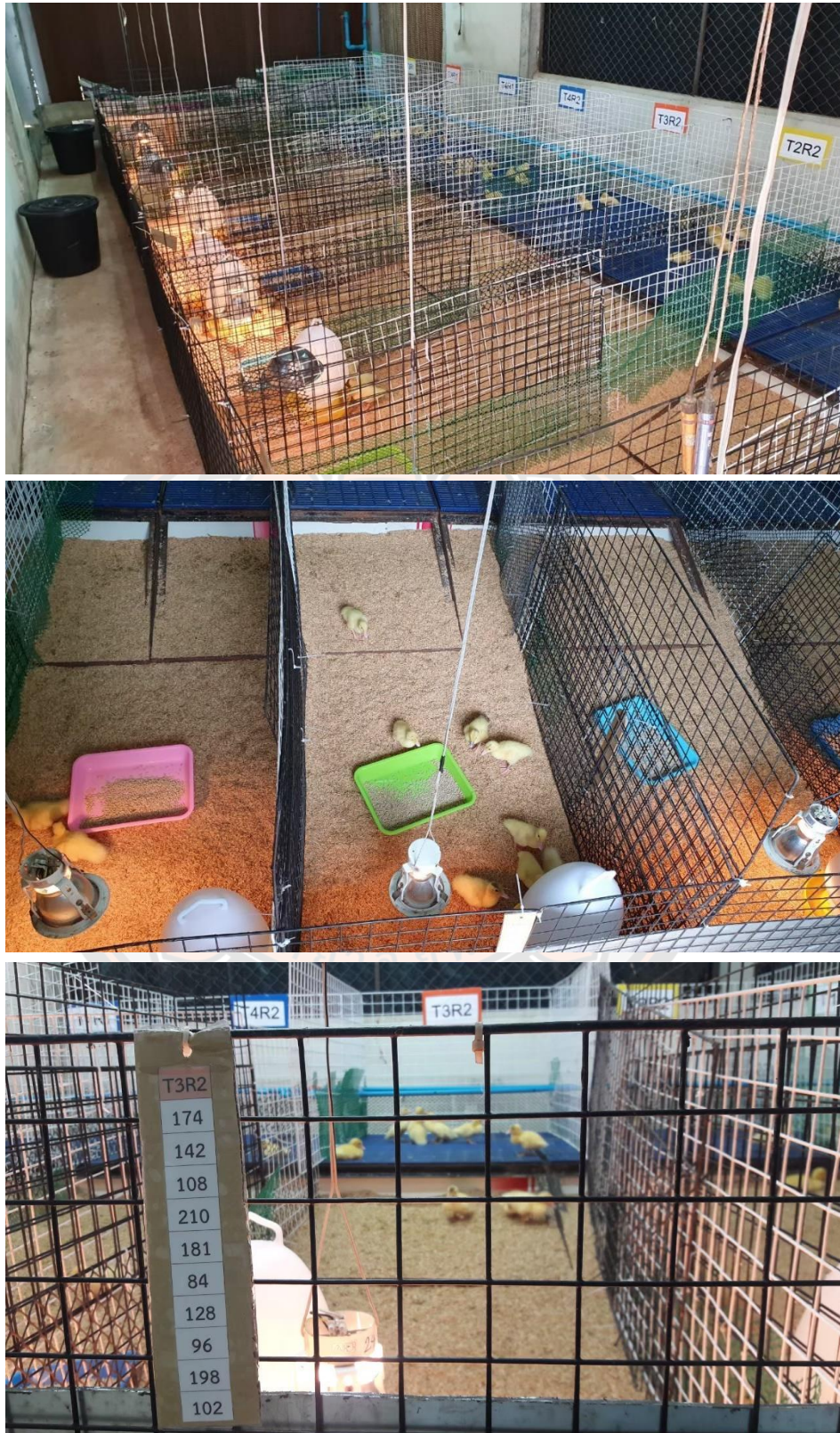


Figure 34 การจัดการเปิดเนื้อที่อายุ 0 - 7 วัน

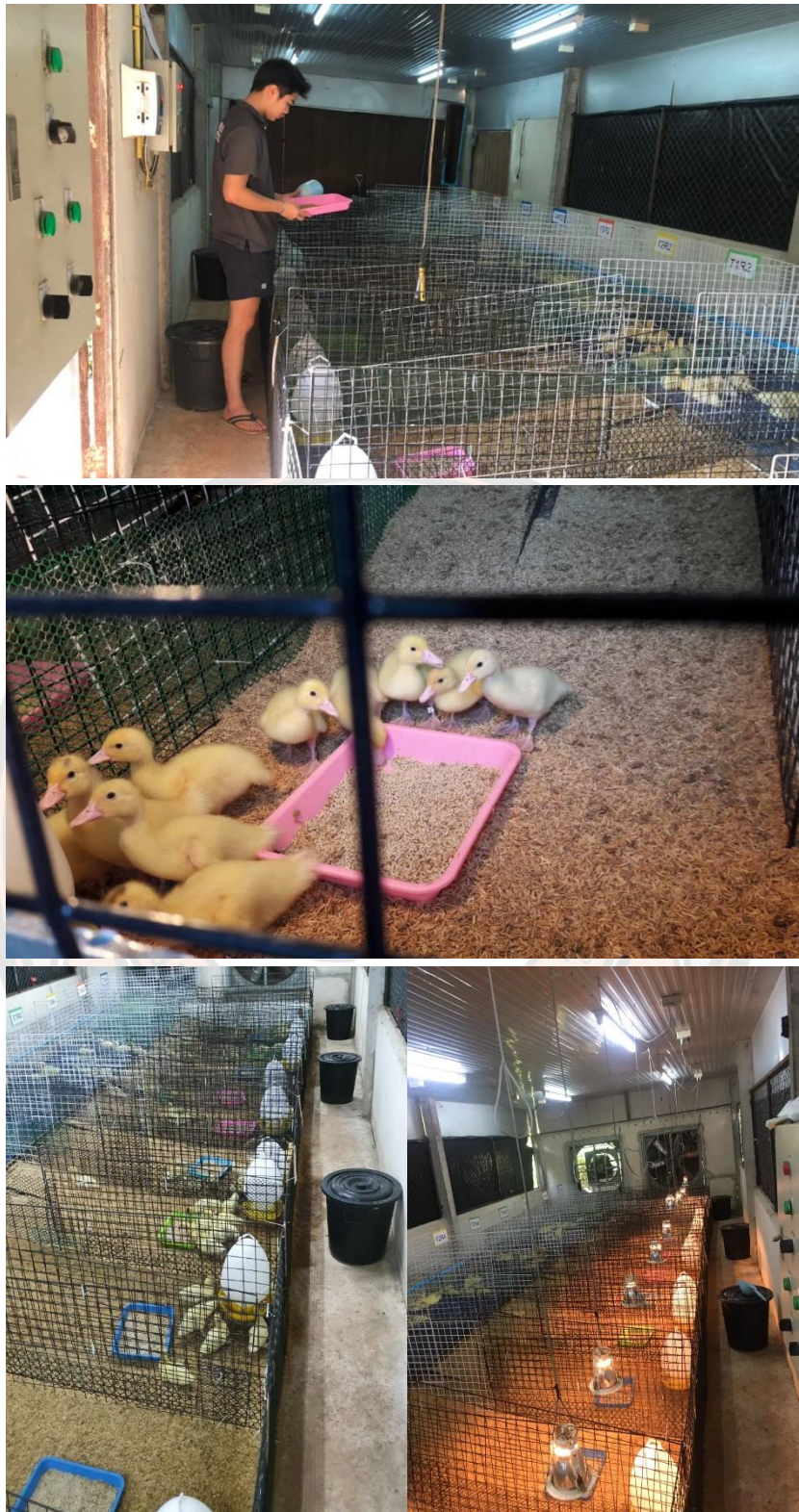


Figure 35 การจัดการเปิดเนื้อที่อายุ 8 - 14 วัน



Figure 36 การจัดการเปิดเนื้อที่อายุ 15 - 21 วัน

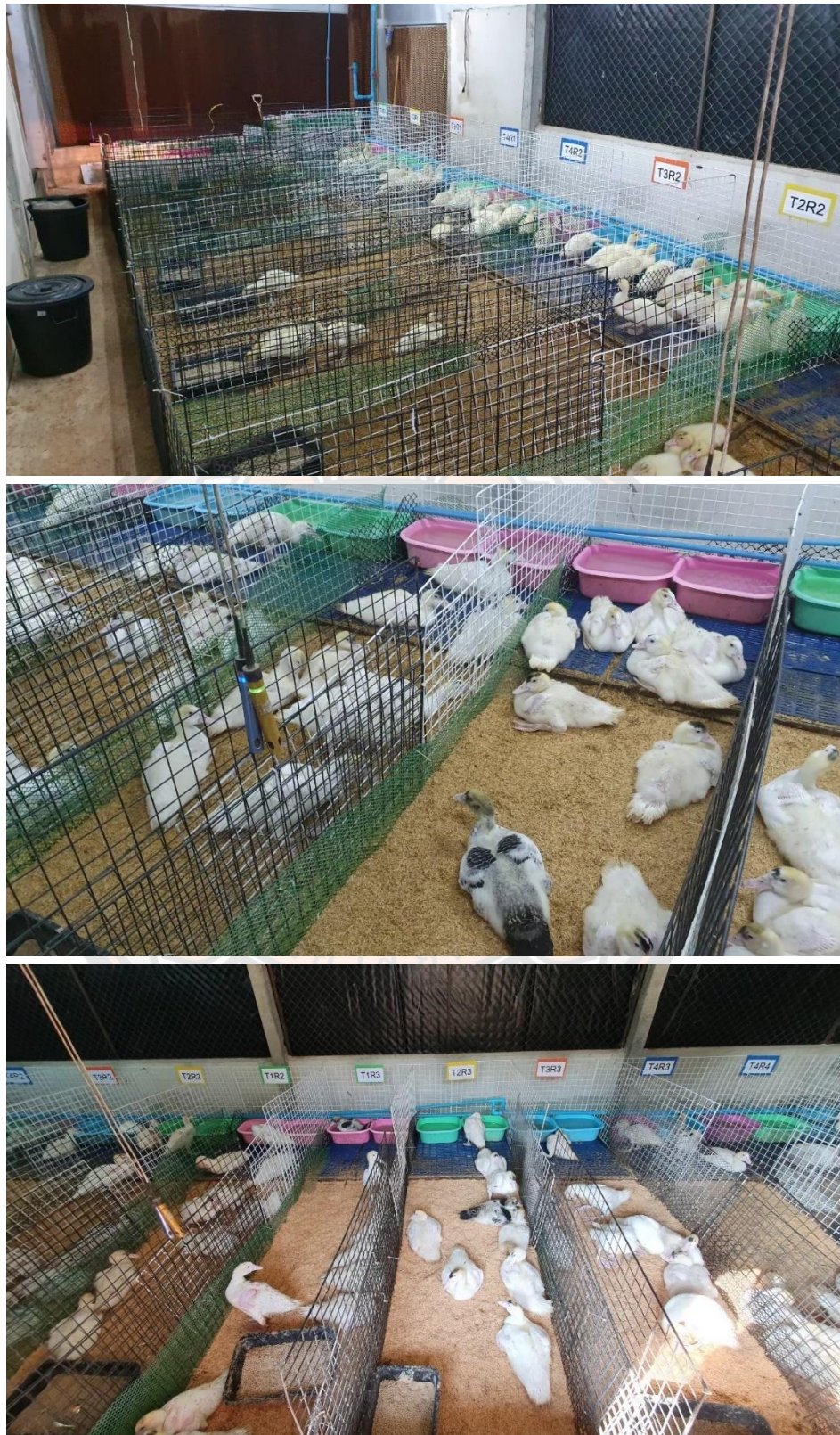


Figure 37 การจัดการเป็ดเนื้อที่อายุ 22 - 28 วัน

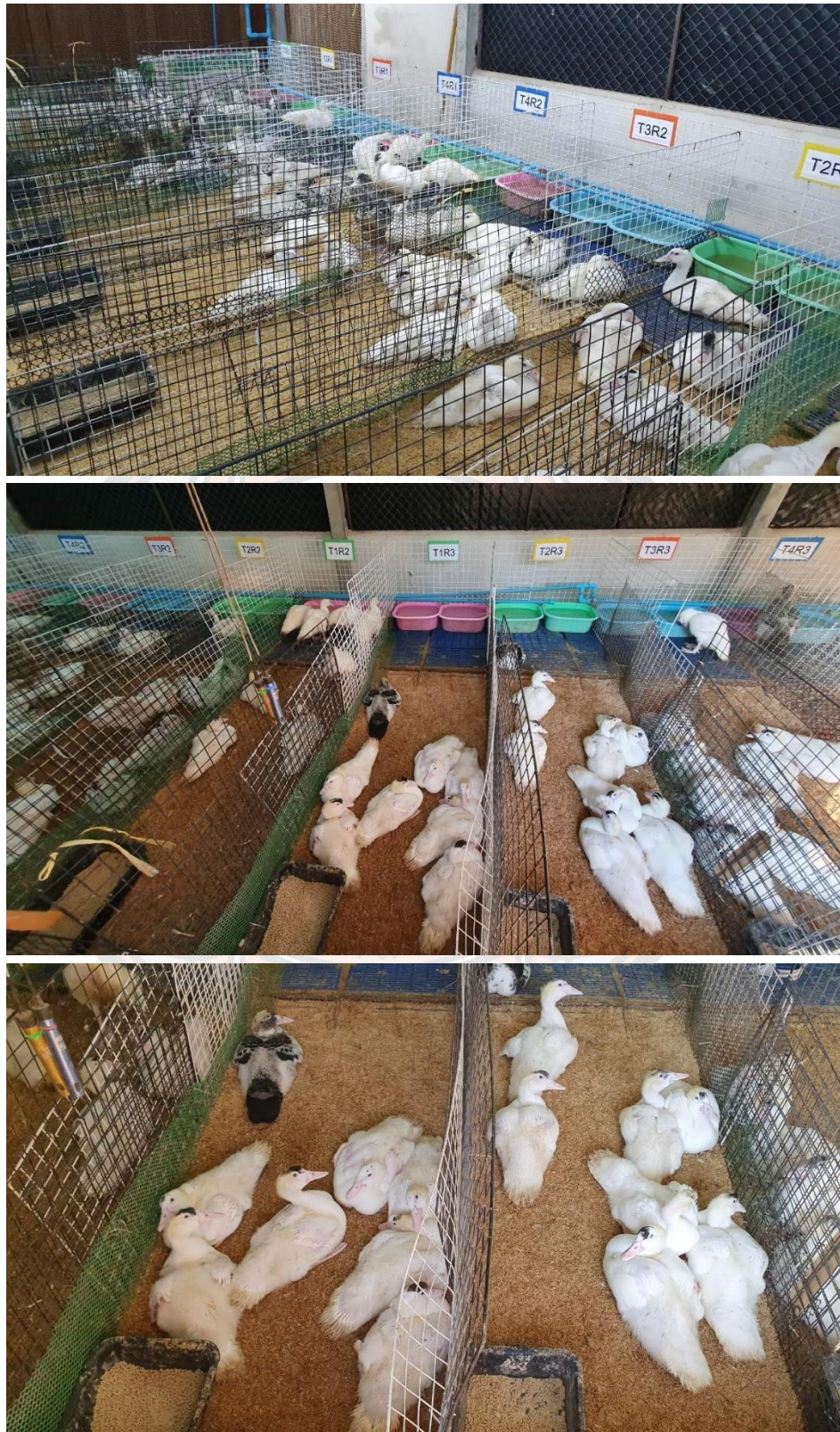


Figure 38 การจัดการเป็ดเนื้อที่อายุ 29 - 35 วัน



Figure 39 การจัดการเป็ดเนื้อที่อายุ 36 - 42 วัน



Figure 40 การจัดการเป็ดเนื้อที่อายุ 43 - 49 วัน



Figure 41 การจัดการเป็ดเนื้อที่อายุ 50 - 56 วัน

ภาคผนวก ง วิธีการเก็บและเตรียมตัวอย่าง



Figure 42 อุปกรณ์เก็บตัวอย่างซาก (ภาพบน) ตัวอย่างม้ามเปิดเนื้อที่อายุ 14 วัน (ภาพล่าง)

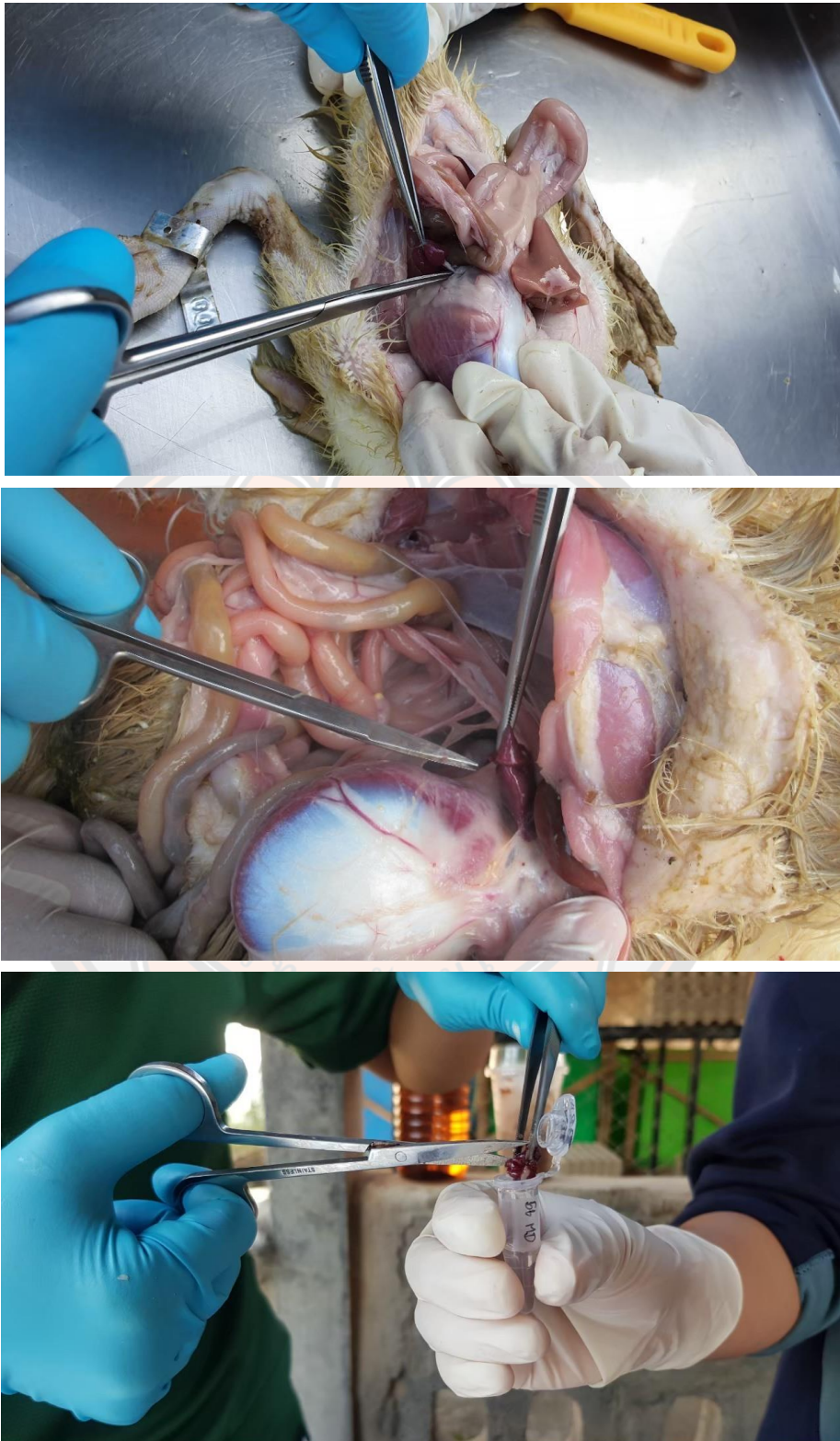


Figure 43 เก็บตัวอย่าง้ามเปิดเนื้อที่อายุ 35 วัน (ภาพบน) และตัวอย่าง้ามเปิดเนื้อที่อายุ 56 วัน (ภาพล่าง)

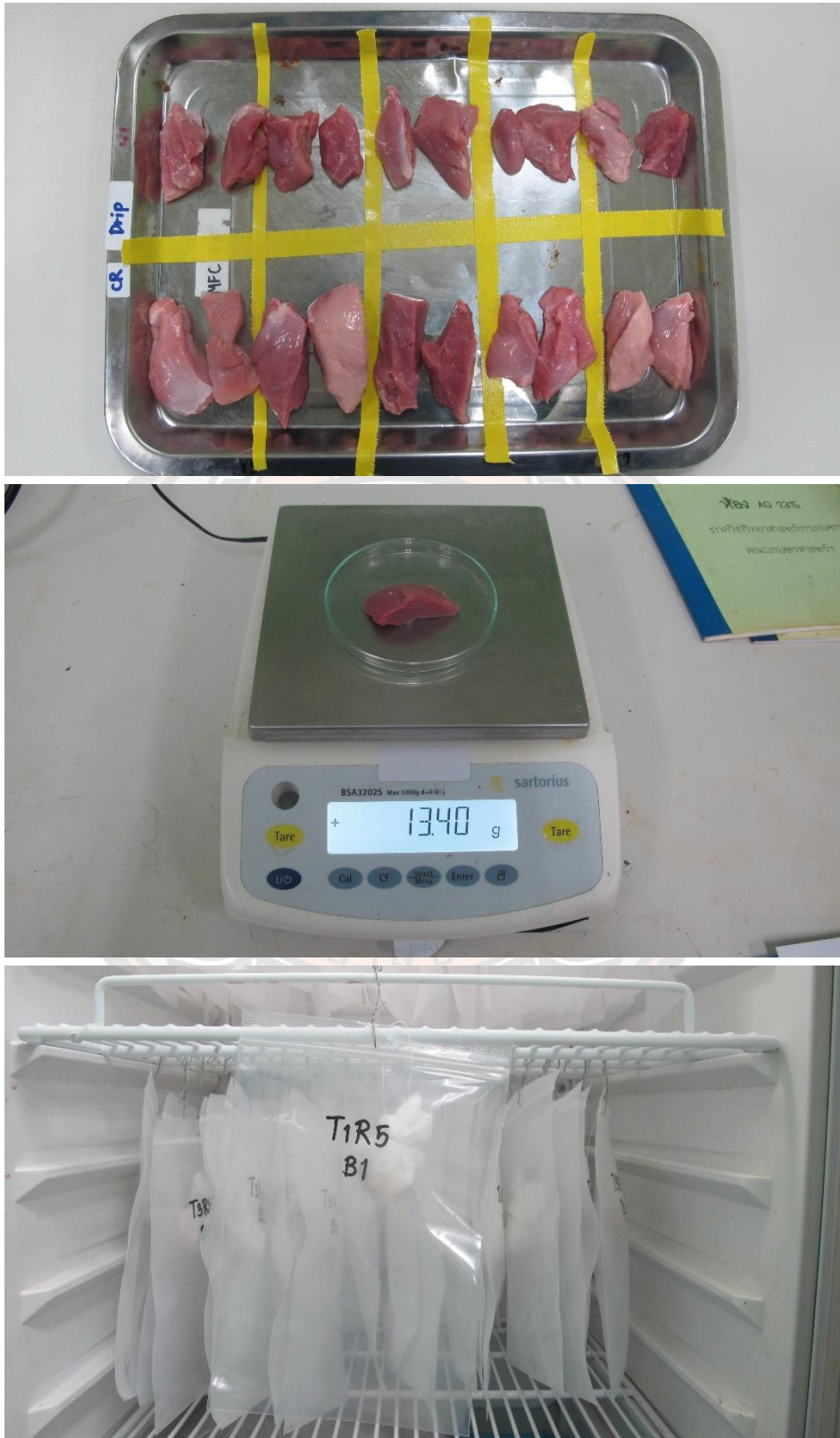


Figure 44 การสูญเสียน้ำขณะเก็บ (Drip loss)

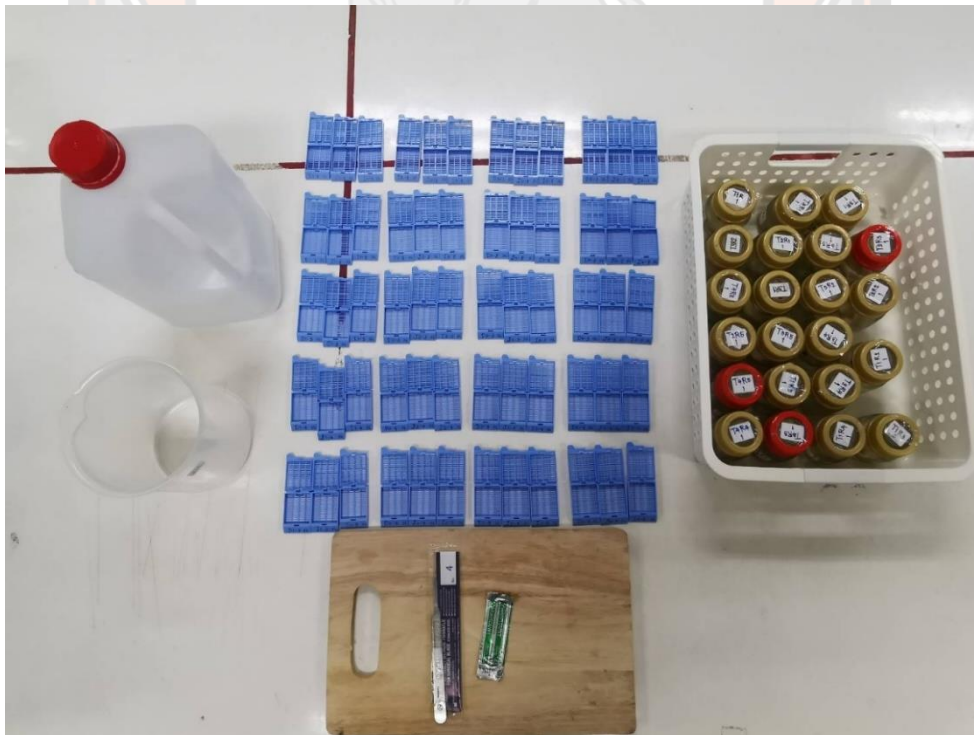


Figure 45 การเตรียมอุปกรณ์เก็บตัวอย่างอย่างสัณฐานวิทยาไส้เล็ก

การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ

ชั่งน้ำหนักเปิดเนื้อและเฉลี่ยน้ำหนักของเปิดเนื้อในกลุ่มทดลองทุกตัวให้มีค่าใกล้เคียงกันมากที่สุด จากนั้นสุ่มมากลุ่มทดลองละ 5 ตัว หลังจากนั้นทำการฆ่าด้วยวิธีการวางยาสลบโดยการฉีด Sodium thiopental ปริมาตร 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้าที่เส้นเลือดดำบริเวณปีก เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อประมาณ 0.5 มิลลิกรัม ใส่ใน tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และใส่ในถังไนโตรเจนเหลว

1. นำตัวอย่างเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ ประมาณ 0.5 มิลลิกรัม ใส่ใน tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. เติม Trizol (Ribozol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และ Homogenization และเติม tissue lysis buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกันด้วยปิเปตตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที
3. เติม Chloroform ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าด้วยมือเบา ๆ กลับไป – มา นำไปปั่นตก 12,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที
4. ดูดส่วนของเหลวใสชั้นบน (supernatant) ประมาณ 500 ไมโครลิตร ใส่ tube ใหม่ ระวังอย่าให้ตะกอนส่วนล่างติดมาด้วย
5. เติมสารละลาย Isopropanol อัตราส่วน 1 : 1 (RNA : Isopropanol) นำไปปั่นตก 12,000 rpm นาน 15 นาที เทสารละลายทิ้ง (Isopropanol)
6. เติมสารละลาย 75% Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไป vortex และปั่นตก 7,500 rpm นาน 15 นาที เทสารละลายส่วนของเหลวใสทิ้ง (Ethanol) ออกให้หมด ระวังอย่าให้ตะกอน RNA บริเวณก้น tube ตกหล่น
7. เปิดฝา tube ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 30 นาที หรือจนกว่าตะกอนจะใส
8. เติม DEPC water (DNase/RNase free water) ปริมาตร 25 – 50 ไมโครลิตร
9. นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที
10. วัดค่าความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ RNA ด้วยเครื่อง nanodrop ที่ความยาวคลื่น

A260/A280

วิธีการตัดแต่งซากเป็ดเนื้อ

1. หลังจากการการุณยฆาตเป็ดเนื้อ จับเวลาหลังจากเป็ดเนื้อตาย 45 นาที วัดค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 45 นาที (pH_{45})
2. เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ ประมาณ 0.5 มิลลิกรัม ใส่หลอดทดลอง (tube) 1.5 มิลลิลิตรโดยใช้ forceps และกรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
3. หลังจากนั้นลวกซากเป็ดเนื้อในน้ำร้อนอุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 58 องศาเซลเซียส (ประมาณ 60-70 องศาเซลเซียส) นานประมาณ 2 นาที นำซากไก่ไปถนอมขนด้วยเครื่องถนอมขนอัตโนมัติ โดยไม่ทำลายคุณภาพซาก หลังจากถนอมขนเรียบร้อยแล้วให้ตรวจดูขนอ่อนที่หลงเหลืออยู่ให้ใช้แหนบถอนเพื่อกำจัดขนอ่อนออกให้หมดและล้างน้ำให้สะอาด
4. ใช้มีดเปิดช่องท้องส่วนล่าง ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับใช้กรรไกรผ่าตัดและ forceps ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เพื่อไม่ให้มีอัมผัสสัมผัสกับตัวอย่างเนื้อเยื่อตับ หลังจากนั้นเปิดช่องท้องให้มีขนาดกว้างพอที่จะนำเครื่องในออก (visceral organs) โดยระวังไม่ให้กระเพาะ ลำไส้ และถุงน้ำดีฉีกขาด แล้วชั่งน้ำหนักเครื่องในรวม จากนั้นแยกเครื่องในขาวและเครื่องในแดง ล้างทำความสะอาดเครื่องใน นำไปชั่งน้ำหนักแต่ละส่วนรวมทั้งน้ำหนักซากอุ่น และจดบันทึกข้อมูล
5. ล้างซากไก่ด้วยน้ำสะอาดอีกครั้ง แล้วตัดแยกซากออกเป็นชิ้นส่วนต่าง ๆ เริ่มจากตัดส่วนหัวไก่ (head) ออกจากส่วนคอ (neck) ตรงบริเวณข้อต่อ (atlas joint) ตัดแข็งโดยใช้มีดตัดตรงบริเวณรอยต่อของข้อขาให้ได้แข็งติดเท้า ใช้มีดกรีดหนังบริเวณหลังจากหอยจนถึงกัน จากนั้นทำการกรีดหนังและเนื้อด้านหน้าออกจากคอจนถึงปลายกระดูกอก (sternum) ต่อมาใช้กรีดหนังบริเวณหลังตรงกระดูกซี่โครงสุดท้าย จะสังเกตเห็นหนังบริเวณหลังถูกแบ่งออกเป็น 4 ส่วน
6. การแยกส่วนสะโพกใช้มีดกรีดหนังจากหลังลงมาตามซอกขา ควรจัดแบ่งให้หนังบริเวณขาและหน้าอก โดยใช้มีดตัดแยกส่วนขาสะโพกออกจากลำตัวไก่ตามแนวกระดูกตามความเหมาะสมของชิ้นส่วนใช้ปลายมีดตัดกระดูกสะโพก (femur) ที่ติดอยู่กับสันหลังและดึงส่วนขา ซึ่งจะแยกออกเป็นชิ้นส่วนใหญ่ได้ 2 ส่วน คือ สะโพก (thigh) และน่อง (drumstick)
7. การแยกส่วนเนื้ออก (breast) ออกจากส่วนลำตัว โดยใช้มีดตัดแต่งไปบนกระดูกใบพาย (scapula) และตัดไปหาโคนปีก และพยายามอย่าให้ส่วนปีกขาดหลุดออกจากลำตัว ตัดเอ็นและเนื้อเยื่อบริเวณโคนปีกให้ขาดและดึงปีกไก่เนื้อหน้าอกจะหลุดออกมาจากตัวไก่
8. เนื้อสันใน (fillet) เมื่อแยกเนื้อออกแล้วจะเห็นว่าเนื้อสันในติดอยู่กับกระดูกอก ให้ใช้มีดตัดเนื้อสันในออกมา 2 ข้าง
9. ตัดแต่งส่วนเกิน เนื้อ หนัง (trimming) ให้เรียบร้อย นำชิ้นส่วนย่อย (retail cuts) ที่ตัดแต่งเรียบร้อยแล้วมาชั่งน้ำหนักแต่ละชิ้นส่วน บันทึกน้ำหนักที่วัดได้มาคำนวณร้อยละของชิ้นส่วนย่อย (percentage)

ประวัติผู้วิจัย

Name : Miss. Thitima Pechrkong
Address : 31/32 Soi 9 Nai Mueang subdistrict, Mueang Phitsanulok district, Phitsanulok 65000, Thailand
Telephone : +66 8-7359-3561
Nationality : Thai
Date of Birth : January 2, 1991
Place of Birth : Uthai Thani, Thailand
Age : 33
Email Address : thitimap61@nu.ac.th

Education/Qualifications:

Thesis title: Factors affecting on gut microbiota and immune-related gene expression of duck in Thailand
 2014-2017 M.Sc. (Agricultural Science) student in Tropical Animal Production (GPA: 3.43), Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok

Thesis title: Genetic diversity and effect of dietary protein levels on gene expression, productive performance and meat quality in Thai indigenous chick
 2010-2013 B.Sc. (Agricultural Science) in Animal Science (GPA: 2.97), Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok

Skills:

Computer skill: Microsoft Office, Word, Excel, Power point, GENEALX and SPSS

English language: Speaking (fair), reading (good) and writing (good)

Laboratory skills:

DNA and RNA extraction, Next-generation sequencing (NGS), PCR-RFLP, Reverse-Transcriptase PCR, Agarose gel electrophoresis, Real-time PCR, Meat quality analysis, etc.

Reference:

Assoc. Prof. Dr. Rangsun Charoensook Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University, Tel. 06-3856-3556

Publication

Thitima Pechrkong, Noraphat Hwanhlem, Worasak Kaewkong, Pakpoom Subsoontorn, Tossaporn Incharoen, Wandee Tartrakoon, Sonthaya Numthuam, Guillermo Jiménez, and Rangsun Charoensook. Effect of *Bacillus toyonensis* BCT-7112^T supplementation on growth performance, intestinal morphology, immune-related gene expression, and gut microbiome of Barbary ducks.

Thitima Pechrkong, Worasak Kaewkong, Noraphat Hwanhlem, Wandee Tartrakoon, Tossaporn Incharoen, Sonthaya Numthuam and Rangsun Charoensook. The Interleukin 6 (IL-6) gene expression is decreased by probiotic supplementation in young Barbary ducks. 2564. *Khon Kaen Agriculture Journal*. 48(1) 89-94.

Participated in conference

Oral presentation: “APF: Poultry science WPSA Thailand branch annual meeting 2021” 25 November 2021

Oral presentation: The Interleukin 6 (*IL-6*) gene expression is decreased by probiotic supplementation in young Barbary ducks, the 22nd Agricultural Conference on 25-26 January 2021, Khon Kaen University

Scholarships/Award

- 2021 Certificate for 1st runner-up award (oral presentation), the 22nd Agricultural Conference on 25-26 January 2021, Khon Kaen University
- 2020 Agricultural research development agency (Public organization) research funds for graduate student, 2020

Works experience

- 2022 Research assistance on study the “Effect of cold plasma technology application on growth-related gene expression in Thai meat type chickens”
Funding source: Science and Technology Park, Chiang Mai University
- 2021 Research assistance on study the “Growth Performance, Intestinal Morphology and Immune-related Gene Expression of Broilers Fed Dietary LP Pro and Sodium Propionate”
Funding source: House wellness Foods Corporation, JAPAN
- 2020 Research assistance on study the “Effect of probiotic *Bacillus toyonensis* (Toyocerin®) on growth performance and intestinal microflora of weaning, growing and finishing pigs”
Funding source: RUBINUM, S.A., SPAIN (Add agreement)
- 2019 Research assistance on study the “Effect of probiotic *Bacillus toyonensis* (Toyocerin®) on growth performance and intestinal microflora of weaning, growing and finishing pigs”
Funding source: RUBINUM, S.A., SPAIN

- 2018-2019 Research assistance on study the “Effect of probiotic *Bacillus toyonensis* (Toyocerin®) on growth performance, meat quality and cecal microflora populations in meat ducks
Funding source: RUBINUM, S.A., SPAIN
- 2018-2019 Research assistance on study the “Immunostimulant Supplements and Instant Energy for Pigs”
Funding source: ARDA and Betagro
- 15-17 May 2018 Teaching assistance on workshop of “Field data collection aggregate using Open Data Kit and Google fusion” at Red Dragon hotel, Phitsanulok province, Thailand
- 20-21 April 2018 Teaching assistance on workshop of “Field data collection aggregate using Open Data Kit and Web GIS for elderly database system” at Nan province, Thailand
- 12-13 March 2018 Teaching assistance on Web Feature Service training at Nakhonsawan province, Thailand
- 15-16 January 2018 Teaching assistance on Google fusion and Web Map Service at Phitsanulok province, Thailand
- 2017 Research assistance on study the effect of dietary Immunobiotic LP pro on performance, Intestine morphology and Immune response gene expression in broiler chicken project.
Funding source: House Wellness Food Co., LTD. Japan

Effect of *Bacillus toyonensis* BCT-7112^T supplementation on growth performance, intestinal morphology, immune-related gene expression, and gut microbiome in Barbary ducks

Thitima Pechrkong,^{*} Tossaporn Incharoen,^{*} Noraphat Hwanhlem,^{*,‡} Worasak Kaewkong,^{*,†} Pakpoom Subsoontorn,^{*,†} Wandee Tartrakoon,^{*} Sonthaya Numthuam,^{*} Guillermo Jiménez,^{*,‡} and Rangsum Charoensook,^{*,1}

^{*}Division of Animal Science and Feed Technology, Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, 65000 Phitsanulok, Thailand; [†]Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, 65000 Phitsanulok, Thailand; and [‡]Rubinum S.A., 08191 Rubí, Catalonia, Spain

ABSTRACT This study aimed to investigate the effect of *Bacillus toyonensis* BCT-7112^T supplementation on growth performance, intestinal morphology, immune-related gene expression, and the cecal microbiota of meat ducks. A total of 150 one-day-old male Barbary ducks were divided into 3 groups with 5 replicates ($n = 10$ ducks per replicate) by completely randomized design and offered diets supplemented with the commercial product Toyocerin (containing 1×10^9 *B. toyonensis* BCT-7112^T viable spores/g product) at the levels of 0, 500, or 1,000 mg/kg (0, 500, or 1,000 ppm), respectively, for 8 wk. The results showed that although ducks in the 500 ppm *B. toyonensis* BCT-7112^T group displayed numerically better values (e.g., weight gain and feed conversion ratio) than those in the control group, the growth performance of ducks fed diets supplemented with *B. toyonensis* BCT-7112^T did not differ significantly from that of the control group ($P > 0.05$). There were no significant differences in the intestinal mucosal morphology of ducks across the experimental groups ($P > 0.05$). However, ducks in the 500 ppm *B.*

toyonensis BCT-7112^T group showed a trend of greater values, for example, villus height per crypt depth of duodenum ($P = 0.16$) and ileum ($P = 0.12$) compared with those in the control group. The relative expression of immune-related genes, for example, interferon (*IFN*) and interleukin-6 (*IL-6*) in the meat duck spleen was significantly lower in both *B. toyonensis* BCT-7112^T groups at 14 d and 35 d than in the control group ($P < 0.05$). Beta diversity analysis of the cecal microbiota of ducks in either the 500 ppm or the 1,000 ppm *B. toyonensis* BCT-7112^T group showed to have higher diversity than that in the control group, where at the phylum level, Bacteroidetes was the most abundant, followed by Firmicutes, and at the genus level, Bacteroides, Fusobacterium, and Ruminococcaceae were the top 3 most abundant genera. In conclusion, our study demonstrates that 500 ppm supplementation with *B. toyonensis* BCT-7112^T in duck diets can reduce proinflammatory cytokine gene expression, improve immunological function, and increase the variety of microbial communities in the ceca of meat-type ducks.

Key words: *Bacillus toyonensis*, ducks, gut microbiome, immune response, probiotics

2023 Poultry Science 102:102991
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102991>

INTRODUCTION

In Thailand and throughout the rest of Southeast Asia, the Barbary duck is considered to be one of the most important breeds of duck. Because it grows faster, produces larger carcasses, tastes good, and serves as a

household protein source. It has traditionally been farmed for human consumption for a long time. Nowadays, industrial farming has become the focus of livestock producers as a way to increase output (Charoensook et al., 2013). The animals were raised in a high-density environment under intense production pressure, potentially exposing them to many types of stress and infection pathogens. These factors negatively impacted their productivity and health. Antibiotic growth promoters (AGPs) are therefore often used as supplemental feed in poultry production (Incharoen et al., 2019). However, prolonged usage of AGPs may

© 2023 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Poultry Science Association Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Received May 24, 2023.

Accepted July 28, 2023.

¹Corresponding author: rangsumc@nu.ac.th

The *Interleukin 6 (IL-6)* gene expression is decreased by probiotic supplementation in young Barbary ducks

Thitima Pechrkong^{1,2}, Worasak Kaewkong³, Noraphat Hwanhlem¹, Pakpoom Subsoontorn³, Wandee Tartrakoon¹, Tossaporn Incharoen¹, Sonthaya Numthum¹, Tiranun Srikanchai^{4,5} and Rangsun Charoensook^{1,2*}

¹ Division of Animal Science and Feed Technology, Department of Agricultural Sciences, Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand

² Laboratory of Molecular Animal Genetics and Biotechnology, Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand

³ Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, 65000 Phitsanulok, Thailand

⁴ Faculty of Agroindustry, Panyapiwat Institute of Managements, Nontaburi, Thailand

⁵ Charoen Pokphand Foods Public Company Limited (CPF), Bangkok, Thailand

* Corresponding author: rangsunc@nu.ac.th

ABSTRACT: The present study was conducted to evaluate the effects of probiotic supplementation on productive performance traits and gene expression level of interleukin 6 (*IL-6*) that acts as a major pro-inflammatory cytokine in young duck. A total of 200 one-day-old male Barbary ducks were randomly separated to 4 dietary treatments, and each treatment consisted of 5 replicates with 10 birds. The four dietary treatments included the basal diet (control group), the basal diet supplemented with probiotic at different level such as 0.02%, 0.05% and 0.10% (0.02% group, 0.05% group and 0.10% group, respectively) from 1 to 14 days of age. In addition to growth performance parameters, 6 ducks with a live weight close to the group average were selected from each group and euthanized to collect the spleen tissue for gene expression analysis at 14 days old. Result showed that probiotic supplementation had no significant differences on body weight, weight gain, average daily gain, feed intake and feed conversion ratio. However, the gene expression level of probiotic supplemented group, as measure in the spleen was lower than control group ($P < 0.05$). This present study suggests that dietary probiotics have some properties to regulate the pro-inflammatory cytokine gene expression such as *IL-6*, and could be used as the feed additive to promote health and immune system in young duck.

Keywords: Barbary duck; *IL-6* gene expression; Immune system; Probiotics

Introduction

Nowadays the livestock producer focuses on the factory farming system to produce a large amount of livestock. Because of this, the animals have been raised in a high-density area and managed under intensive production pressure, which might expose them to various kinds of infection and stress, resulting in negative impacts on their health and productivity (Incharoen et al., 2019). Thus, the antibiotic growth promoters (AGPs) have been used in animal production in to increase an animal production by maintaining animal health and improving feed efficiency (Cogliani et al., 2011). However, the use of antibiotics has resulted in an emergence of microbe resistance and transfer of antibiotic resistance gene from animal to human microbiota. For a decade, probiotics bacteria have been used in poultry production as an