



Vet Integr Sci

Veterinary Integrative Sciences

ISSN: 2629-9968 (online)

Website: www.vet.cmu.ac.th/cmvj



Research article

Effect of lactobacilli probiotics supplementation on intestinal bacteria and growth performance in weaned pigs

Sudthidol Piyadeatsoontorn^{1,*}, Pairat Sornplang², Udom Chuachan³, and Bopit Puyati³

¹Faculty of Agricultural and Technology, Rajamangala University of Technology Isan, Surin 32000 Thailand

²Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, KhonKaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³Veterinary Research and Development Center (Lower Northeastern Region) Nabua, Surin 32000, Thailand

Abstract

The objectives of this study were to evaluate the effect of lactobacilli probiotics supplementation on intestinal bacteria and growth performance in weaned pigs. A total of 48 weaned pigs (Landrace x Largewhite x Duroc) with 5.4 kg body weight (19-24 days old) were allotted into 4 groups as follows: T1 given basal diet (B) without probiotics (control group), T2 given B + single-strain (*Lactobacillus plantarum* strain L21) probiotics at 1×10^9 CFU/ml/day/pig, T3 given B + multi-strain (*L. plantarum* strain L21 and L80, *L. paraplantarum* strain L103) probiotics at 1×10^9 CFU/ml/day/pig, and T4 given B + commercial probiotics, consisted of *Bacillus subtilis*, *L. acidophilus* and *Saccharomyces cerevisiae* at 0.25 g/pig/day. Feed and water were provided ad libitum throughout the experimental period. Nutrition provided as recommended by the national research council (NRC). Probiotics were given by oral gavage for 28 days. The results showed that T3 and T4 groups had an average daily gain (ADG) at 321 g was greater than the other groups. In contrast, an average daily feed intake (ADFI) at 401 g, feed per gain ratio (F: G) at 1.25, were lower than other groups. The fecal *Escherichia coli* decreased and Lactic Acid Bacteria (LAB) increased at 3.58-4.76 and 8.03-8.25 log CFU/ml, respectively at day 28, 35, 42, and 49 compared with the control group ($p < 0.05$). This study indicated that multi-strain probiotics supplementation at 21-49 days old in weaned pigs was increasing growth performance and the amount of LAB, and decreasing the amount of *E. coli* greater than either non- or single-strain probiotics supplementation groups.

Keywords: Lactic acid bacteria, Multi-strains, Productive performance, Probiotics, Weaned pigs

*Corresponding author: Sudthidol Piyadeatsoontorn. Faculty of Agricultural and Technology, Rajamangala University of Technology Isan, Nok-Muang, Muang District, Surin 32000, Thailand. Tel (+66) 044-153090 E-mail: sudthidol@gmail.com

Article history: received manuscript: 21 April 2018, revised manuscript: 11 June 2018, accepted manuscript: 3 July 2018, published online: 12 September 2018

Academic editor: Korakot Nganvongpanit



Open Access Copyright: ©2018 Author (s). This is an open access article distributed under the term of the Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution, and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author (s) and the source.

บทนำ

โพรไบโอติก (probiotic) ได้ถูกกำหนดความหมายเมื่อเร็วๆ นี้ว่าหมายถึง สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่เมื่อให้ในปริมาณที่เพียงพอแล้วส่งผลที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้ที่ได้รับ (Hill et al., 2014) โดยจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกนั้นต้องนำมาผ่านกระบวนการคัดเลือกและทดสอบคุณสมบัติที่ดี และสามารถนำไปผลิตเป็นโพรไบโอติกในรูปแบบผลิตภัณฑ์ เพื่อให้สามารถนำไปใช้ในโฮสต์ (host) เป้าหมายและเกิดประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของโฮสต์ที่นำไปใช้ตามวัตถุประสงค์ของผู้ผลิตโพรไบโอติกนั้น ซึ่งในอุตสาหกรรมการผลิตสุกร มีการใช้จุลินทรีย์ ที่คุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก เพื่อใช้ในระบบการเลี้ยง โดยมุ่งหวังเพื่อช่วยเสริมภูมิคุ้มกันร่างกาย เพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโต (Roselli et al., 2017) และที่สำคัญเป็นการลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสุกรตามข้อกำหนดคณะกรรมการยุโรป (The European Commission) ที่ระบุว่าห้ามใช้ยาปฏิชีวนะเร่งการเจริญเติบโต (Antibiotic Growth Promoter, AGP) ทุกชนิด ผสมในอาหารสัตว์โดยมีผลตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม ค.ศ.2006 (Millet and Maertens, 2011) ดังนั้นโพรไบโอติกจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้ทดแทนยาปฏิชีวนะและใช้เพื่อเสริมประสิทธิภาพในการเลี้ยงสุกร โดยเฉพาะในลูกสุกรหย่านม โพรไบโอติกสามารถช่วยลดความสูญเสียของลูกสุกรช่วงระยะหย่านมถึงหลังหย่านม อันเนื่องมาจากสภาวะความเครียดที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงชนิดและลักษณะของอาหาร สิ่งแวดล้อม ที่อยู่อาศัย และสังคมใหม่ (Bosi and Trevisi, 2010) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่นำมาใช้เป็นโพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ทั้งที่ใช้เชื้อสายพันธุ์เดียว (single-strain) และแบบใช้เชื้อหลายสายพันธุ์รวมกัน (multi-strains) ซึ่งในระยะแรกของการศึกษามีการใช้ single-strain ทั้งในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) และทดลองในสัตว์ (*in vivo*) พบว่ามีประสิทธิภาพและมีความเหมาะสมที่นำมาทำเป็นโพรไบโอติก (Cai et al., 2014; Sonia et al., 2014; Qiao et al., 2015; Tufarelli et al., 2017) มีการศึกษาเพิ่มเติมที่เกี่ยวข้องกับการใช้เชื้อโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพหลายสายพันธุ์รวมกัน พบว่ามีความได้เปรียบเกี่ยวกับการให้ประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตที่ดีกว่าในลูกสุกรหย่านมเมื่อเปรียบเทียบกับโพรไบโอติกชนิด single-strain (Cai et al., 2015; Lan et al., 2016b; Balasubramanian et al., 2018) แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีข้อมูลบางส่วนที่ขัดแย้งว่าการใช้โพรไบโอติกชนิด single-strain ให้ประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตในลูกสุกรหย่านมดีกว่าโพรไบโอติกชนิด multi-strains (Zhao et al., 2018) ซึ่งสะท้อนให้เห็นว่าข้อมูลจากการศึกษาก่อนหน้านี้ยังไม่มากพอและอาจมีกลไกอื่นของการเสริมโพรไบโอติกชนิด multi-strains ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกรหลังหย่านมเมื่อเปรียบเทียบกับการเสริมโพรไบโอติกชนิด single-strain ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้จึงทำการศึกษาผลของการเสริมโพรไบโอติกทั้งชนิด single-strain และ multi-strains ต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตในลูกสุกรหย่านม

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมโพรไบโอติก

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่เรียกลูมิที่ผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) ที่มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกที่ได้จากการแยกและคัดเลือกจากมูลสุกร และจำแนกเชื้อโดยวิธีหาลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์ของ ยีน 16S rRNA ได้เป็น *Lactobacillus plantarum* (strain L21 และ strain L80) และ *L. paraplantarum* strain L103 (Piyadeatsontorn et al., 2018) ที่เก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -80 องศา

เซลเซียส ในห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวแพทยศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยนำ LAB ดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลว de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 ชั่วโมง และได้ปริมาณ LAB ไม่น้อยกว่า 10^9 CFU/ml เตรียมเชื้อ LAB ที่คัดเลือกได้ ทั้งแบบสายพันธุ์เดี่ยว (single-strain) และหลายสายพันธุ์ (multi-strains) ด้วยวิธีการ microencapsulation แบบ micro-beads (MB) โดยเก็บเซลล์จากการปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบเป็นเวลา 15 นาที และล้างเก็บเซลล์ด้วย phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และเก็บเซลล์โดยนำส่วน PBS ออก ให้คงเหลือแต่เซลล์ (Rathnayaka, 2013) สำหรับเชื้อที่เป็น multi-strains ให้เก็บเซลล์ของเชื้อ LAB ที่คัดเลือกได้จากการปั่นเหวี่ยง 1 มิลลิลิตรของ LAB แต่ละชนิด โดยใช้ skimmed milk 20% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาละลายเชื้อให้ได้ทั้งสามชนิดในปริมาณ 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเชื้อแต่ละชนิดในปริมาณเท่ากันอย่างละ 10^9 CFU/ml นำ LAB ทั้งชนิดสายพันธุ์เดี่ยวและหลายสายพันธุ์ที่ผสมกับ skimmed milk 20% ให้ได้ปริมาณ 1 มิลลิลิตรแล้ว มาผสมกับสารละลาย sodium alginate 1.8% ที่ปราศจากเชื้อในสัดส่วน 1:2 (skimmed milk : sodium alginate) หยดส่วนผสมที่ได้ในสารละลาย calcium chloride (CaCl_2) 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ด้วยไซริงค์ขนาดเล็ก ทำอย่างนุ่มนวล เพื่อให้หยดส่วนผสม LAB ใน skimmed milk และ sodium alginate ทำปฏิกิริยากับ CaCl_2 จนเกิดผลึกเป็นก้อนขนาดเล็ก (micro-beads) เมื่อได้ก้อนผลึกแล้วให้ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 รอบ (Ross et al., 2008) เก็บรักษาในถุงพลาสติกและใส่อากาศออกให้หมด เก็บไว้ในที่แห้งและเย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป ทั้งนี้พบว่า MB จำนวนเฉลี่ย 24 แคปซูลจะมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่นำมาผลิตในปริมาณไม่น้อยกว่า 10^9 CFU/ml เมื่อนำมาละลายในสารละลาย PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

สัตว์ทดลองและการวางแผนการทดลอง

ในการทดลองใช้ลูกสุกรหย่านมที่มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง จำนวน 48 ตัว (แลนด์เรซ × ลาร์จไวท์ × ดูร์โรค มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ยไม่น้อยกว่า 5.4 กิโลกรัม อายุ 19 – 21 วัน) โดยการสุ่มแบ่งจำนวนลูกสุกรออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง กลุ่มการทดลองละ 4 ตัว โดยแต่ละตัวมีลูกสุกรเพศจำนวน 3 ตัว ที่มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ยเท่ากัน โดยแบ่งกลุ่มการทดลองตามลักษณะการเสริมโปรไบโอติกดังนี้ กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เสริมโปรไบโอติกในการเลี้ยง (T1) กลุ่มที่เสริมโปรไบโอติกสายพันธุ์เดี่ยวที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* strain L21 ให้ในปริมาณ 1×10^9 CFU/ml/pig/day (T2) กลุ่มที่เสริมโปรไบโอติกสามสายพันธุ์ ประกอบด้วย *L. plantarum* (strain L21 และ strain L80) และ *L. paraplantarum* strain L103 ที่มีปริมาณเชื้อเท่ากันและให้ในปริมาณ 1×10^9 CFU/ml/pig/day (T3) และกลุ่มที่เสริมผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกในที่จำหน่ายเชิงการค้าโดย 1,000 กรัม มีส่วนประกอบของเชื้อ *Bacillus subtilis* ความเข้มข้น 1×10^{12} CFU, *L. acidophilus* ความเข้มข้น 1.5×10^7 CFU, *Saccharomyces cerevisiae* ความเข้มข้น 1×10^9 CFU และเติมสื่อที่เป็นสารชีวภาพให้ครบปริมาณ 1,000 กรัม (Probiotic Lacto Plus, Chairat, Thailand Reg No. 01 04 46 0748) โดยเสริมในปริมาณ 0.25 g/pig/day (T4) ซึ่งความเข้มข้นของโปรไบโอติกมีชีวิตกลุ่ม LAB ที่ Yan et al. (2015) แนะนำสำหรับเสริมในการเลี้ยงสุกรนั้นไม่ควรต่ำกว่า 1×10^6 CFU/ml เป็นทั้งนี้ตลอดการทดลอง ทุกกลุ่มการทดลองได้รับอาหารชนิดเดียวกันที่มีคุณค่าทางโภชนาการตามมาตรฐาน National Research Council (NRC, 2012) (Table 1) ให้ลูกสุกรกินอาหารแบบไม่จำกัด และมีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา โดยลูกสุกรทั้งหมดเลี้ยงด้วยกันในโรงเรือนแบบเปิด พื้นคอกเป็นตะแกรงเหล็ก ขนาดคอก 3 × 4 เมตร จำนวนคอกละ 12 ตัวต่อกลุ่มการทดลอง โดยสุกรทุกตัวจะ

หมายเลขประจำตัวเพื่อบอกกลุ่มการทดลอง และภายในคอกมีจุ่มน้ำที่มีแรงดันต่ำ มีหลอดไฟอินฟราเรด (infrared) ให้ความอบอุ่นในช่วงอากาศเย็น ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 60–70 ตลอดช่วงการเลี้ยง วิธีการทดลอง (protocol) ในสัตว์ได้รับอนุญาตจาก คณะกรรมการจรรยาบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงการใช้สัตว์เพื่องานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย เลขที่อนุญาต 38/60

Table 1 Compositions of basal diets, g/kg (as-fed basis).

Items	Weaning pig diets
<i>Ingredients (g/kg)</i>	
Corn	52.8
Wheat bran	5
Soybean meal (CP 44%)	30.3
Fish meal (CP 55%)	6
Animal fat	3.5
Dicalcium phosphate (P18)	1.8
Salt	0.35
Vitamin and mineral (premix) ^a	0.25
<i>Analyzed composition</i>	
Crude Protein (%)	22.5
Metabolize energy (kcal/kg)	3,240

^a Vitamin provided per kg diet: vitamin A, 25,000 IU; vitamin D₃, 4,500 IU; vitamin E, 95 IU; vitamin K₃, 12 mg; vitamin B₁, 5 mg; vitamin B₂, 22 mg; vitamin B₆, 8 mg; vitamin B₁₂, 0.10 mg; vitamin E, 45 IU; Mineral provided per kg diet: 140 mg of Cu; 75 mg of Fe; 176 mg of Zn; 13 mg of Mn; 1 mg of I; 0.20 mg of Co; and 0.3 mg of Se.

วิธีการทดลองและการเก็บตัวอย่าง

เชื้อโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้และเตรียมในรูปแบบ MB ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาละลายในสารละลาย PBS ในอัตราส่วน 24 แคปซูลต่อมิลลิลิตร เตรียมให้ได้ปริมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วนำมาผสมกับน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อในสัดส่วน 1:1 ทำให้ได้ปริมาณรวมของสารละลาย 100 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นเชื้อ LAB ประมาณ 10⁹ CFU ต่อ 2 มิลลิลิตร) บรรจุลงในขวดสำหรับปั๊มสารละลายขนาด 300 มิลลิลิตร ให้โปรไบโอติกโดยวิธีการป้อนโดยตรง โดยใช้สารละลายโปรไบโอติกสำหรับกลุ่มที่เสริมโปรไบโอติกหรือน้ำสะอาดสำหรับกลุ่มที่ไม่เสริมโปรไบโอติก โดยการปั๊มสารละลายเข้าในช่องปากข้างกระพุ้งแก้มของสุกรในปริมาณ 2 มิลลิลิตร ทุกวันในช่วงเช้าเป็นระยะเวลา 28 วัน ตามรูปแบบที่กำหนดในแต่ละกลุ่มการทดลอง

เก็บตัวอย่างมูลสุกรในวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 ของการทดลอง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ LAB และ *Escherichia coli* ซึ่งน้ำหนักสุกรและอาหารเพื่อวัด อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (average daily gain, ADG) ปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อวัน (average feed daily intake, AFDI) ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (feed conversion ratio, F:G) เก็บตัวอย่างมูลของสุกร โดยวิธีการสุ่มเพื่อเป็นตัวแทนใน

แต่ละซ้ำของกลุ่มการทดลอง (Lee et al., 2014) โดยการทำให้ rectal swab ด้วยไม้พันสำลีหนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วเก็บใน หลอดที่มี Lapt-soft agar medium โดยมี agar 0.8% (w/v) แล้วนำไปซึ่งน้ำหนักรวมกันโดยนำน้ำหนักของไม้พันสำลีที่ยังไม่ทำ rectal swab และน้ำหนักของหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อนี้มาหักออก ก็จะได้น้ำหนักของตัวอย่างมูลสุกรที่เก็บ โดยในการคำนวณหาปริมาณเชื้อดังกล่าวมีหน่วยเป็นโคโลนีต่อกรัม (CFU/g) (Ross et al., 2010) เพื่อประเมินปริมาณเชื้อ *E. coli* ที่พบได้โดยรวมในลำไส้และ LAB โดยตรวจนับปริมาณ LAB และเชื้อ *E. coli* โดยทำการเจือจางตัวอย่างด้วย peptone 0.1% ที่ปราศจากเชื้อ แล้วทำ serial tenfold dilution ของ LAB และเชื้อ *E. coli* และ เพาะเชื้อด้วยเทคนิค pour plate จากปริมาตร 1 มิลลิลิตรของแต่ละระดับการทำเจือจาง สำหรับ LAB ให้ใช้อาหารแข็ง MRS ที่มีส่วนผสม CaCO₃ 0.4% แล้วนำไปหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *E. coli* ให้ใช้อาหารแข็ง Eosin Methylene Blue (EMB) เพื่อตรวจนับโคโลนี คำนวณหาค่า CFU/g

ผลการศึกษา

ผลของการเสริมโปรไบโอติกที่ได้จากการแยกและคัดเลือก LAB จากมูลสุกรที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกรหย่านมในช่วงอายุ 21 – 49 วัน พบว่าน้ำหนักโดยเฉลี่ยของกลุ่ม T3 และ T4 มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักมากกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่ม T2 ดังแสดงใน Table 2 นอกจากนี้ในแต่ละช่วงอายุการเลี้ยงสุกร พบว่าวันที่ 28 กลุ่ม T3 และ T4 มี ADG มากกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกันกับ F:G กลุ่ม T3 และ T4 มี F:G มีค่าต่ำกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วน ADFI พบว่าในวันที่ 42 และ 49 กลุ่ม T3 และ T4 มี ADFI ต่ำกว่ากลุ่มอื่น นอกจากนี้ยังพบว่าในวันที่ 28 กลุ่ม T3 และ T4 มี F:G ต่ำกว่ากลุ่มอื่น สำหรับการเลี้ยงตลอดช่วงอายุการทดลอง 28 วันพบว่า กลุ่ม T3 และ T4 ให้ ADG (321 กรัม, 321 กรัม), ADFI (401 กรัม, 402 กรัม) และ F:G (1.25, 1.25) ต่ำกว่ากลุ่มอื่น

Table 2 Effect of probiotics on productive performance of weaned pigs. (n=12, Mean±SD)

Item	T1	T2	T3	T4
Body weight, kg				
initial, 21 day	5.56±0.06	5.56±0.06	5.56±0.06	5.56±0.06
28 day	7.20 ^a ±0.06	7.23a±0.07	7.27 ^b ±0.07	7.29 ^b ±0.08
35 day	9.22 ^a ±0.07	9.22 ^a ±0.06	9.27 ^b ±0.08	9.28 ^b ±0.06
42 day	11.38±0.09	11.38±0.09	11.44±0.10	11.46±0.08
49 day	14.44 ^a ±0.12	14.52 ^b ±0.06	14.54 ^b ±0.07	14.54 ^b ±0.07
Productive performance of pig 28 day old				
ADG, g	234.80 ^a ±7.20	239.50 ^a ±10.55	244.16 ^b ±4.04	247.67 ^b ±9.12
ADFI, g	247.50±2.61	249.00±1.04	247.50±2.61	249.00±1.04
F:G	1.06 ^a ±0.03	1.04 ^a ±0.05	1.02 ^b ±0.02	1.01 ^b ±0.04
Productive performance of pig 35 day old				
ADG, g	288.17±10.35	283.33±10.47	285.83±8.75	284.33±14.45
ADFI, g	346.50±1.57	345.50±2.61	344.00±1.04	346.50±1.57
F:G	1.21±0.04	1.22±0.04	1.21±0.04	1.22±0.06
Productive performance of pig 42 day old				
ADG, g	308.25±11.27	309.33±9.12	310.50±6.33	310.58±8.89
ADFI, g	440.50±2.61	438.00±0.00	437.00±1.04	436.00±0.00
F:G	1.43±0.06	1.42±0.04	1.41±0.03	1.40±0.04
Productive performance of pig 49 day old				
ADG, g	438.08±18.59	447.67±10.90	442.92±14.80	440.58±11.89
ADFI, g	580.00±1.04	579.00±0.00	575.00±1.04	573.50±2.61
F:G	1.33±0.06	1.30±0.03	1.30±0.04	1.30±0.04
Productive performance of pig overall (21-49 day old)				
ADG, g	317.08±4.64	319.92±2.71	320.75±4.05	320.67±3.34
ADFI, g	403.50±1.57	403.00±1.04	401.00±0.00	401.50±0.52
F:G	1.27 ^a ±0.02	1.26 ^b ±0.01	1.25 ^b ±0.02	1.25 ^b ±0.01

Treatments were as follows: T1: non-probiotic; T2: single strain probiotic (*Lactobacillus plantarum* strain L21); T3: multi-strains probiotics (*L. plantarum* strain L21, *L. paraplantarum* strain L103, *L. plantarum* strain L80); T4: commercial probiotics consisted *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*

^{a-b}Values with different superscripts in the same row differ significantly (p<0.05)

ปริมาณ *E. coli* ที่ตรวจพบในมูลสุกร พบว่ามีค่าเฉลี่ยปริมาณของ *E. coli* อยู่ในช่วง 7.55–7.85 log CFU/ml และ LAB อยู่ในช่วง 8.07–8.10 log CFU/ml ของทุกกลุ่มการทดลองเมื่อเริ่มต้นการเลี้ยง ภายหลังการเสริมด้วยโปรไบโอติกตลอดการเลี้ยงพบว่าปริมาณ *E. coli* ในกลุ่ม T2, T3 และ T4 มีปริมาณ *E. coli* ที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญอย่างยิ่ง ($p < 0.05$) โดยปริมาณ *E. coli* ในกลุ่ม T2, T3 และ T4 มีค่าเฉลี่ยลดลงอยู่ในช่วง 3.58–4.76 log CFU/ml และเช่นเดียวกัน ปริมาณ LAB ใน T2, T3 และ T4 มีปริมาณมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และโดยเฉพาะช่วงอายุ 35, 42 และ 49 นอกจากนี้พบว่าตลอดการทดลองในกลุ่ม T2, T3 และ T4 มีค่าเฉลี่ยปริมาณ LAB อยู่ในช่วง 8.03–8.25 log CFU/ml ดังแสดงใน Table 3

Table 3 Effect of probiotic on fecal *Escherichia coli* (*E. coli*) and lactic acid bacteria (LAB) concentration in weaned pigs. (n=4, Mean±SD)

Treatments	Fecal bacteria concentration (log CFU/g)									
	21 day old		28 day old		35 day old		42 day old		49 day old	
	<i>E. coli</i>	LAB	<i>E. coli</i>	LAB	<i>E. coli</i>	LAB	<i>E. coli</i>	LAB	<i>E. coli</i>	LAB
T1	7.85±0.54	8.07±0.20	7.02 ^a ±0.30	7.69 ^a ±0.07	5.67 ^a ±0.90	7.64 ^a ±0.06	5.66 ^a ±0.25	7.62a±0.03	6.07a±0.26	7.63a±0.08
T2	7.55±0.77	8.09±0.12	4.76 ^b ±0.11	8.03 ^b ±0.08	4.36 ^b ±0.25	8.03 ^b ±0.03	4.11 ^b ±0.27	8.05b±0.03	3.93b±0.06	8.14b±0.07
T3	7.79±0.56	8.08±0.18	4.67 ^b ±0.22	8.15 ^b ±0.14	4.36 ^b ±0.21	8.17 ^b ±0.10	3.91 ^{bc} ±0.22	8.17c±0.04	3.59c±0.09	8.21bc±0.03
T4	7.74±0.74	8.10±0.17	4.56 ^b ±0.29	8.19 ^b ±0.16	4.25 ^b ±0.23	8.18 ^c ±0.11	3.74 ^c ±0.09	8.21c±0.06	3.58c±0.07	8.25c±0.03

Treatments were as follows: T1: non-probiotic; T2: single strain probiotic (*Lactobacillus plantarum* strain L21); T3: multi-strains probiotics (*L. plantarum* strain L21, *L. paraplantarum* strain L103, *L. plantarum* strain L80); T4: commercial probiotics consisted *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*.

^{a-c} Values with different superscripts in the same column differ significantly ($p < 0.05$)

วิจารณ์

กลุ่มที่มีการเสริมโปรไบโอติกโดยเฉพาะกลุ่ม T3 และ T4 ที่ใช้เชื้อหลายสายพันธุ์ ให้ค่าน้ำหนักเฉลี่ย ADG, ADFI และ F:G ดีกว่ากลุ่มอื่น ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า การเสริมโปรไบโอติกหลายสายพันธุ์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของสุกรได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Cai et al., 2015; Lan et al., 2016b; Balasubramanian et al., 2018) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Zhao et al. (2018) ที่พบว่า การเสริมโปรไบโอติกสายพันธุ์เดียว (*Enterococcus faecium* DSM 7134) ให้ผลดีต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของลูกสุกรหย่านมเมื่อเทียบกับการเสริม LAB หลายสายพันธุ์ ทั้งนี้ผลที่ต่างกันอาจเนื่องมาจากผู้ศึกษาเลือกใช้สายพันธุ์และความเข้มข้นของเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก รวมถึงถึงสภาวะสุขภาพสุกรและสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน ทั้งนี้พบว่าผลของเสริมโปรไบโอติกในสุกร ช่วยปรับปรุงความสามารถระบบทางเดินอาหารในการย่อยโภชนะ ได้แก่ วัตถุแห้ง (dry matter) อินทรีย์วัตถุ (organic matter) พลังงานที่สันดาปได้ (gross energy) โปรตีนรวม (crude protein) เยื่อใย (crude fiber) และฟอสฟอรัส (phosphorus) โดยอาศัยกลไกการทำงานของเชื้อ LAB ในการสร้างกรดแลคติกและเอนไซม์ที่ประโยชน์ในการช่วยย่อยสารอาหาร เช่น amylase, lipase, phytase และ protease (Liao and Nyachoti, 2017) ปริมาณ LAB ที่เพิ่มขึ้นของการศึกษาครั้งนี้ อาจส่งผลเพิ่มความยาวของเยื่อลำไส้ (intestinal villi) ในกลุ่มที่เสริมโปรไบโอติกทำให้ลูกสุกรสามารถดูดซึมสารอาหารได้ดีขึ้น (Cai et al., 2015) จากการศึกษาในครั้งนี้หากเปรียบเทียบโปรไบโอติกสายพันธุ์เดียว (*L. plantarum* strain L21) พบว่าตลอดการเลี้ยง 28 วัน ค่าน้ำหนักเฉลี่ย ADG, ADFI และ F:G ดีกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งให้

ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Suo et al. (2012) ที่พบว่า *L. plantarum* ZJ316 ในขนาด 1×10^9 CFU/day ช่วยเพิ่มน้ำหนักเจริญเติบโตต่อวัน และประสิทธิภาพการใช้อาหารอย่างมีนัยสำคัญ และเช่นเดียวกัน Lee et al. (2012) พบว่า การเสริม *L. plantarum* CJLP243 ในขนาด 10^{10} CFU/kg ในอาหารสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารตลอดระยะเวลาการเลี้ยงลูกสุกรหย่านม 28 วัน และการศึกษาของ Cai et al. (2014) ที่พบว่าการใช้ *L. plantarum* เสริมในอาหารลูกสุกรหย่านมอายุ 21 วัน ในปริมาณ 5×10^{11} CFU/kg ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตและการใช้อาหารอย่างมีนัยสำคัญ มีรายงานการศึกษาการใช้ *L. plantarum* ร่วมกับสารเสริมอื่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) พบว่า การใช้ fructooligosaccharide ร่วมกับ *L. plantarum* ในรูปแบบ encapsulation ให้ผลดีต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตในลูกสุกรหย่านม (Wang et al., 2017) นอกจากนี้การใช้ *L. plantarum* เป็นพาหะที่มีถิ่นในการสร้าง porcine lactoferrin ในลูกสุกรหย่านมสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของลูกสุกรได้ (Xu et al., 2016)

ปริมาณของ *E. coli* ในมูลลูกสุกรหย่านมภายหลังจากการเสริมโปรไบโอติก 1 - 4 สัปดาห์ พบว่ามีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งจาก 2.46 ถึง 2.49 log CFU/ml ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pieper et al. (2010) ที่เสริม *L. plantarum* (DSMZ8862/8866) ในลูกสุกรหย่านมเพื่อลดอาการท้องเสียที่เกิดจากการป้อนเชื้อ *E. coli* O149:K91 พบว่ามีปริมาณเชื้อ *E. coli* ลดลง 0.18 ถึง 0.44 log CFU/g และสอดคล้องเช่นเดียวกับ Dowarah et al. (2017) ที่พบว่า การเสริม *L. acidophilus* NCDC-15 สามารถลดปริมาณ *E. coli* ในสุกรหลังหย่านมอายุ 28 วัน นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับหลายงานทดลองที่พบว่า การเสริมเชื้อแลคโตบาซิลลัสหลายสายพันธุ์ แบบเชื้อชนิดเดียวในอาหาร เช่น *L. acidophilus* 0.1% หรือ *L. plantarum* (1.6×10^9 CFU/kg) ในลูกสุกรหย่านม โดยเสริมในลูกสุกรหย่านมเป็นเวลา 28 วัน ทำให้ปริมาณ *E. coli* ลดลง 0.23 และ 0.14 log CFU/g ในช่วงวันที่ 14 และ 42 ภายหลังจากการเสริมโปรไบโอติกแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacilli*) ตามลำดับ (Lan et al., 2016a; Wang et al., 2017) โดยทั่วไปแล้วเชื้อ *E. coli* เป็นทั้งเชื้อประจำถิ่นและเป็นเชื้อที่มีโอกาสก่อโรคที่พบได้เป็นปกติในทางเดินอาหารของคนและสัตว์ จากการศึกษาของ Dong et al. (2018) ที่แยกเชื้อแบคทีเรียจากอุจจาระลูกสุกรที่มีอาการท้องเสีย พบเชื้อ *E. coli* 81 ไอโซเลท คิดเป็น 97.59% และในจำนวนไอโซเลทเหล่านี้ มีไอโซเลทที่มีถิ่น ก่อโรคคิดเป็น 55.56% ซึ่งเมื่อนำมาฉีดในหนูทดลองทำให้หนูตาย จากการทดลองนี้พบว่า *E. coli* ลดลงภายหลังจากการเสริมโปรไบโอติกนั้น หากมีการแยกชนิดของ *E. coli* ที่พบเป็นปกติในระบบทางเดินอาหารของลูกสุกรอยู่แล้วออกจาก *E. coli* ที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของลูกสุกรหย่านมด้วยเทคนิคและวิธีการทางชีวโมเลกุล เช่น การตรวจหา ยีนก่อโรค เช่นเดียวกับการศึกษาของ Pieper et al. (2010) ที่ตรวจหา *E. coli* O149:K91 ก็จะทำให้มั่นใจได้ว่า *E. coli* ที่ลดลงนั้นเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคและส่งผลกระทบต่อลูกสุกร โดยกลไกที่ทำให้ปริมาณ *E. coli* ลดลงอาจเกิดจากโปรไบโอติกที่สามารถไปแย่งยึดเกาะเซลล์เยื่อผนังลำไส้และสารอินทรีย์แข่งกับเชื้อ *E. coli* และกลไกในการยับยั้งและต้าน *E. coli* โดยตรงจากการสร้างกรดอินทรีย์ defensins, reuterin และแบคทีริโอซิน (bacteriocin) (Liao and Nyachoti, 2017) ในด้านการเสริมโปรไบโอติกในอาหารต่อปริมาณเชื้อ LAB ในลำไส้ในลูกสุกรหย่านมนั้น มีงานทดลองที่แสดงให้เห็นว่าการเสริมดังกล่าวทำให้ปริมาณ LAB ในลำไส้มีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วง 0.05-0.32 log CFU/g (Dowarah et al., 2017; Lan et al., 2016a, 2016b; Wang et al., 2017) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Dlamini et al. (2017) ที่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณ LAB ในมูลลูกสุกรหย่านมในกลุ่มที่เสริมแลคโตบาซิลลัส (6.8×10^9 ถึง 2.8×10^{10} CFU/ml) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์และความเข้มข้นเชื้อแลคโตบาซิลลัส และความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้เพื่อทำหน้าที่ผลิตกรดแลคติกหรือสารต่อต้านเชื้อก่อโรคอย่างอื่นได้ดี เช่นลดปริมาณเชื้อ *E. coli* ชนิดก่อโรค ในทางเดินอาหาร ส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพเจริญเติบโตของสุกรได้ เป็นต้น (Yung et al., 2015)

สรุป

การใช้โปรไบโอติกหลายสายพันธุ์รวมกันเสริมให้ลูกสุกรตลอดช่วงการเลี้ยง (อายุ 21–49 วัน) ให้ผลต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโต (ADG, ADFI และ F:G) ลดปริมาณเชื้อ *E. coli* และเพิ่มปริมาณ LAB ดีกว่าการไม่ได้เสริมหรือการเสริมโปรไบโอติกสายพันธุ์เดียว ทั้งนี้สายพันธุ์โปรไบโอติกที่นำมาใช้ต้องผ่านการตรวจยืนยันยีนสายพันธุ์ มีปริมาณเซลล์มีชีวิตเพียงพอ เช่น ไม่ต่ำกว่า 10^6 CFU/ml ขณะเสริมในสัตว์ โดยอาจมีการเตรียมเชื้อเพื่อเพิ่มความคงตัวของเชื้อก่อนนำไปใช้ เช่น การใช้เทคนิคการห่อหุ้มเชื้อ (encapsulation) เป็นต้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) ผ่านโครงการทุนพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ) PHD5710071 ความเห็นในรายงานผลการวิจัยเป็นของผู้วิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป

REFERENCES

- Balasubramanian, B., Lee, S.I., Kim, I.-H., 2018. Inclusion of dietary multi-species probiotic on growth performance, nutrient digestibility, meat quality traits, faecal microbiota and diarrhoea score in growing–finishing pigs. *Ital J Anim Sci.* 17, 100–106.
- Bosi P, Trevisi P., 2010. New topics and limits related to the use of beneficial microbes in pig feeding. *Benef. Microbes.* 1, 447–454.
- Cai, L., Indrakumar, S., Kiarie, E., Kim, I.H., 2015. Effects of a multi-strains *Bacillus* species–based direct-fed microbial on growth performance, nutrient digestibility, blood profile, and gut health in nursery pigs fed corn–soybean meal–based diets. *J Anim Sci* 93, 4336–4342.
- Cai, Y.H., Aguilar, Y.M., Yu, L., Wang, Y., Liu, H.B., Liu, G., Zhong, J., Jiang, Y.B., Yin, Y.L., 2014. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus plantarum* on growth performance and serum concentration of amino acids in weaned piglets. *Anim. Nutr. Feed Technol.* 14, 411–420.
- Dlamini, Z., Africa, S., Langa, S., Africa, S., Ayobami, O., Agricultural, A., et al., 2017. Effects of probiotics on growth performance , blood parameters , and antibody stimulation in piglets. *Afr J. Anim Sci.* 47, 766–775.
- Dong, H., Zhang, H., Li, K., Mehmood, K., Rehman, M U., Nabi, F., Wang, Y., Chang, Z., Wu, Q., Li, J., 2018. Prevalence and potential risk factors for *Escherichia coli* isolated from Tibetan piglets with white score diarrhea. *Pakistan J Zool* 50, 57–63.
- Dowarah, R., Verma, A.K., Agarwal, N., Patel, B.H.M., Singh, P., 2017. Effect of swine based probiotic on performance, diarrhoea scores, intestinal microbiota and gut health of grower–finisher crossbred pigs. *Livest Sci.* 195, 74–79.

- 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. Expert consensus document: 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, 506–514.
- Lan, R.X., Koo, J.M., Kim, I.H., 2016a. Effects of *Lactobacillus acidophilus* supplementation in different energy and nutrient density diets on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, fecal microbiota shedding, and fecal noxious gas emission in weaning pigs. *Anim Feed Sci Technol.* 219, 181–188.
- Lan, R.X., Lee, S.I., Kim, I.H., 2016b. Effects of multistrain probiotics on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, faecal microbial shedding, faecal score and noxious gas emission in weaning pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr. (Berl.)* 100, 1130–1138.
- Lee, J.S., Awji, E.G., Lee, S.J., Tassew, D.D., Park, Y.B., Park, K.S., Kim, M.K., Kim, B., Park, S.C., 2012. Effect of *Lactobacillus plantarum* CJLP243 on the growth performance and cytokine response of weaning pigs challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Anim Sci* 90, 3709–3717.
- Lee, S.H., Ingale, S.L., Kim, J.S., Kim, K.H., Lokhande, A., Kim, E.K., Kwon, I.K., Kim, Y.H., Chae, B.J., 2014. Effects of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* LS 1–2 fermentation biomass on growth performance, nutrient digestibility, cecal microbiota and intestinal morphology of weanling pig. *Anim Feed Sci Technol.* 188, 102–110.
- Liao, S.F., Nyachoti, C.M., 2017. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Anim Nutr.* 3, 331–343.
- Millet, S., Maertens, L., 2011. The European ban on antibiotic growth promoters in animal feed: From challenges to opportunities. *Vet J.* 187, 143–144.
- NRC, 2012. Nutrient requirements of swine: Eleventh Revised Edition. The National Academies Press, Washington, DC.
- Pieper, R., Janczyk, P., Urubschurov, V., Hou, Z., Korn, U., Pieper, B., Souffrant, W.B., 2010. Effect of *Lactobacillus plantarum* on intestinal microbial community composition and response to enterotoxigenic *Escherichia coli* challenge in weaning piglets. *Livest Sci.* 133, 98–100.
- Piyadeatsoontorn S, Taharnklaew R, Upathanpreecha T, Sornplang P., 2018. Encapsulating viability of multi-strains lactobacilli as potential probiotic in pigs. *Probiotics Antimicrob. Proteins* [WWW Document]. URL <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9418-7>
- Qiao, J., Li, H., Wang, Z., Wang, W., 2015. Effects of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplementation on the performance, intestinal barrier function, rectal microflora and serum immune function in weaned piglets challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107, 883–891.

- Rathnayaka, R.M.U.S.K., 2013. Effect of Freeze - Drying on viability and probiotic properties of a mixture of probiotic bacteria. *ARPN J. Sci. Technol.* 3, 1074–1078.
- Roselli, M., Pieper, R., Rogel-Gaillard, C., de Vries, H., Bailey, M., Smidt, H., Lauridsen, C., 2017. Immunomodulating effects of probiotics for microbiota modulation, gut health and disease resistance in pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 233, 1–16.
- Ross, G.R., Gusils, C., Gonzalez, S.N., 2008. Microencapsulation of probiotic strains for swine feeding. *Biol. Pharm. Bull.* 31, 2121–2125.
- Ross, G.R., Gusils, C., Oliszewski, R., Holgado, DCSGNS., 2010. Effect of probiotic administration in swine. *J. Biosci. Bioeng.* 109, 545-549.
- Sonia, T.A., Ji, H., Hong-Seok, M., Chul-Ju, Y., 2014. Evaluation of lactobacillus and bacillus-based probiotics as alternatives to antibiotics in enteric microbial challenged weaned piglets. *African J. Microbiol. Res.* 8, 96–104.
- Suo, C., Yin, Y., Wang, X., Lou, X., Song, D., Wang, X., Gu, Q., 2012. Effects of *Lactobacillus plantarum* ZJ316 on pig growth and pork quality. *BMC Vet. Res.* 8, 89.
- Tufarelli, V., Crovace, A.M., Rossi, G., Laudadio, V., 2017. Effect of a dietary probiotic blend on performance, blood characteristics, meat quality and faecal microbial shedding in growing-finishing pigs. *South African J. Anim. Sci.* 47, 875–882.
- Wang, W., Chen, J., Zhou, H., Wang, L., Ding, S., Wang, Y., Song, D., Li, A., 2017. Effects of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* and fructooligosaccharide on growth performance, blood immune parameters, and intestinal morphology in weaned piglets. *Food Agric. Immunol.* 0, 1–11.
- Xu, Y.G., Yu, H., Zhang, L., Liu, M., Qiao, X.Y., Cui, W., Jiang, Y.P., Wang, L., Li, Y.J., Tang, L.J., 2016. Probiotic properties of genetically engineered *Lactobacillus plantarum* producing porcine lactoferrin used as feed additive for piglets. *Process Biochem.* 51, 719–724.
- Yang, F., Hou, C., Zeng, X., Qiao, S., 2015. The use of lactic acid bacteria as a probiotic in swine diets. *Pathogens.* 4, 34-45.
- Zhao, P., Zhang, Z., Lan, R., Li, T., Kim, I., 2018. Comparison of efficacy of lactic acid bacteria complex and *Enterococcus faecium* DSM 7134 in weanling pigs. *J. Appl. Anim. Res.* 46, 888–892.

How to cite this article;

Sudthidol Piyadeatsoontorn, Pairat Sornplang, Udom Chuachan and Bopit Puyati. Effect of lactobacilli probiotics supplementation on intestinal bacteria and growth performance in weaned pigs *Veterinary Integrative Sciences.* 2018; 16(3): 211-221
