

ประสิทธิภาพของกรดอินทรีย์ในการควบคุมเชื้อซาลโมเนลลาในไก่กระທ

อินทรา กระหม่อมทอง^{1*} วารี นิยมธรรม¹ นัทธี อออินทร์² พิริยา อุตมะ² วิหุดา ขวัญใจ²

Abstract

Indhira Kramomtong^{1*} Waree Niyomthum¹ Nuttee Am-in² Piriya Uttama² Vichuda Quanjai²

SOME EFFECTS OF ORGANIC ACIDS ON THE CONTROL OF SALMONELLA IN BROILER CHICKENS

Three hundred and sixty day-old chicks were used in this study to investigate the effects of organic acids on the control of *Salmonella*. The chicks were divided into uninoculated and inoculated groups, 180 in each. Both groups were subdivided into 3 further groups of 60 chicks each. The uninoculated, control group comprised of, group 1 : given diluted organic acids 1:1000 via the drinking water, group 2 : given organic acids diluted at 1:2000 and group 3 : given water alone. Each bird in the three inoculated subgroups 4, 5 and 6 were orally dosed with 0.3 ml of brain heart infusion broth culture containing 6×10^8 cfu/ml of *Salmonella* Enteritidis. Group 4 was treated with organic acids at 1:1000 dilution, group 5 : with 1:2000 dilution and group 6 given no treatment. *Salmonella* was cultured from pooled organs, liver, spleen and heart samples, as well as from cloacal swabs in all six subgroups when 10, 20, 30 and 40 days old, respectively. Ten chickens were randomly selected from each subgroup and weighed individually at each stage. The detection rates for *Salmonella*, which could be considered as a natural infection, among the uninoculated control subgroups (1, 2 and 3) showed no difference at 40 days of age, as were the excretion rates determined by positive cloacal swabs ($p > 0.05$). In the inoculated groups, there were no significant differences among groups 4, 5 and 6 for *Salmonella* detection rates at 10, 20 and 30 days of age. The results showed differences only between groups 4 and 6 at 40 days, the same as the exclusion rates ($p < 0.05$). Our study suggested that *Salmonella* detection in the inoculated group, treated with 1:1000 organic acids dilution, was reduced compared with the no treatment group (5% against 35%). In the same way, the excretion rate was lower than in the no treatment group (40% compared to 90%). The feed conversion rate of chickens aged 31-40 days, provided with organic acids in both the uninoculated and the inoculated groups were lower than in the no treatment groups. And the daily weight gains of those treated were greater than those with no treatment.

Keywords : organic acids, *Salmonella*, chicks

¹Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

²The sixth year veterinary students, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

*Corresponding author

¹ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

²นิสิตชั้นปีที่ 6 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

อินทรา กระหม่อมทอง^{1*} วารี นิยมธรรม¹ นัทธี อ่อนจันทร์² พิริยา อุตมะ² วิชุดา ขวัญใจ²

ประสิทธิภาพของกรดอินทรีย์ในการควบคุมเชื้อซาลโมเนลลาในไก่กระทาง

ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของกรดอินทรีย์รวมในการป้องกันการติดเชื้อ *Salmonella Enteritidis* ในลูกไก่กระทางอายุ 1 วัน จำนวน 360 ตัว ด้วยการแบ่งกลุ่มไก่เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมไม่ให้อาหารและกลุ่มทดลองให้อาหาร กลุ่มละ 180 ตัว แต่ละกลุ่มแบ่งเป็นกลุ่มย่อย 3 กลุ่มๆ ละ 60 ตัว ในกลุ่มควบคุมไม่ให้อาหาร (1, 2 และ 3) คือ กลุ่มย่อยที่ 1 ไม่ให้อาหาร *S. Enteritidis* และให้กรดอินทรีย์ในอัตราส่วน 1:1000 ผสมน้ำให้กินทุกวัน กลุ่มที่ 2 ไม่ให้อาหารและให้กรด 1:2000 กลุ่มที่ 3 ไม่ให้อาหารและไม่ให้กรด ส่วนกลุ่มทดลองให้อาหาร (4, 5 และ 6) ให้ *S. Enteritidis* ทุกตัวๆ ละ 0.3 มิลลิกรัมจากปริมาณเชื้อ 6×10^8 cfu/ml คือ กลุ่มย่อยที่ 4 ให้เชื้อและให้กรด 1:1000 กลุ่มที่ 5 ให้เชื้อและให้กรด 1:2000 กลุ่มที่ 6 ให้เชื้อและไม่ให้กรด ทำการบันทึกน้ำหนักอาหารที่ไก่กินทุกวัน ชั่งน้ำหนักตัวไก่และตรวจแยกเชื้อ *S. Enteritidis* จากอวัยวะรวม คือ ตับ ม้าม หัวใจ และสวอปอูจจาระ จากทั้ง 6 กลุ่มย่อยๆ ละ 10 ตัว เมื่ออายุ 10, 20, 30 และ 40 วัน ผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลา จากอวัยวะรวมและสวอปอูจจาระ ในระหว่างกลุ่มควบคุมไม่ให้อาหาร (กลุ่ม 1, 2 และ 3) ซึ่งอาจเป็นการติดเชื้อที่มากับตัวไก่หรือจากสิ่งแวดล้อม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันเมื่ออายุ 40 วัน และเป็นไปในทำนองเดียวกับผลการจัดเชื้อ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลจากการตรวจสวอปอูจจาระ ($p > 0.05$) ในกลุ่มทดลองให้อาหาร เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลา และผลการจัดเชื้อไม่มีความแตกต่างกันในระหว่างกลุ่มที่ 4, 5 และ 6 ในไก่ที่อายุ 10, 20 และ 30 วัน แต่แตกต่างกัน เมื่อไก่อายุ 40 วัน เฉพาะกลุ่มที่ 4 ต่างจากกลุ่มที่ 6 ($p < 0.05$) นั่นคือ ไก่กลุ่มที่ให้อาหารและกรด 1:1000 ตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลา น้อยกว่ากลุ่มที่ให้อาหารและไม่ให้กรด 5% เทียบกับ 35% และสามารถจัดเชื้อออกได้มากกว่ากลุ่มดังกล่าว 90% เทียบกับ 40% ตามลำดับ และยังพบว่า ไก่กลุ่มให้กรดอินทรีย์ทั้งในกลุ่มไม่ให้อาหารและให้อาหาร มีอัตราแลกเปลี่ยนต่ำกว่ากลุ่มไม่ให้อาหารในช่วงอายุ 31- 40 วัน และมีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อวันสูงกว่าด้วย

คำสำคัญ : กรดอินทรีย์ ซาลโมเนลลา ไก่

บทนำ

ปัจจุบันการตกค้างของสารปฏิชีวนะในไก่หรือสัตว์ที่ถูกนำมาใช้เป็นอาหาร เป็นปัญหาสำคัญที่เกษตรกรผู้เลี้ยงและรัฐบาลต้องร่วมกันรับผิดชอบและแก้ไข เนื่องจากทำให้เกิดมาตรการกีดกันทางการค้าการส่งออกระหว่างประเทศคู่ค้า โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อลดการใช้สารปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคในแง่ของการดื้อยาของเชื้อที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ ในมนุษย์ (Malbak et al., 2002) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อซาลโมเนลลา ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มโรคสัตว์ที่ติดถึงคน บางสายพันธุ์ทำให้เกิดอาการปวดท้อง ท้องเสีย อาเจียน และอาจทำให้ถึงแก่ชีวิตในเด็กที่อายุน้อย คนสูงอายุหรือในคนที่มีความไวภูมิคุ้มกันทำงานผิดปกติโดยปนเปื้อนไปกับอาหาร ผักและผลไม้ (Byrd et al, 2001) เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่า เนื้อไก่และไข่ไก่เป็นแหล่งแพร่เชื้อมาสู่มนุษย์ (Varavithya et al., 1990; Misher et al., 1991; Guard and Pette, 2001; Rose

et al., 2002) ดังนั้นจึงต้องมีการป้องกัน และพยายามลดการปนเปื้อนของเชื้อซาลโมเนลลาและเชื้อก่อโรคอื่นๆ ตั้งแต่ขั้นตอนการเลี้ยงไก่ในโรงเรือน เพื่อตัดวงจรของเชื้อสู่ผู้บริโภค วิธีหนึ่ง คือ การใช้กรดอินทรีย์ (organic acid) ชนิดต่างๆ โดยทั่วไป ผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของกรดอินทรีย์เกี่ยวข้องกับการทำให้ค่าความเป็นกรดและด่าง (pH) ลดลง ซึ่งกรดอินทรีย์จะละลายได้ในไขมัน และอยู่ในรูป undissociated form ที่สามารถเข้าสู่เซลล์ของเชื้อได้ ภายในเซลล์ กรดจะแตกตัวให้ประจุบวก (H+) ทำให้ pH ภายในเซลล์ลดลงมีผลต่อขบวนการเมตาบอลิซึมยังการสังเคราะห์โปรตีนที่สำคัญต่อเชื้อและทำให้เชื้อต้องใช้พลังงานที่จะปรับให้อยู่ในสภาพสมดุล ในขณะที่ประจุลบ (RCOO-) จากกรด ขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนและ DNA ทำให้เซลล์ไม่สามารถ replicate หรือทำซ้ำได้ แม้ว่า pH ในทางเดินอาหารจะลดลงบ้าง แต่ไม่นับสำคัญ ซึ่งไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่

สร้างกรดแลคติก (Canibe et al., 2001)

รายงานที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ การทดลองนำกรดอินทรีย์ที่มีส่วนผสมของกรดซิตริกไปให้ไก่กิน เพื่อลดจำนวนเชื้อ *S. Enteritidis* ในกระเพาะปัสสาวะของไก่ที่ป้อนเชื้อมานี้ไว้ก่อน กล่าวกันว่ากระเพาะปัสสาวะเป็นแหล่งหนึ่งของการปนเปื้อนเชื้อในซากไก่ ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ (Barnhart et al., 1999) และอีกการศึกษาหนึ่ง ใช้น้ำที่มีส่วนผสมของกรดอินทรีย์ (0.5% กรดอะซิติก แลคติก หรือฟอรั่มิก) ให้ไก่กินพบว่าจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ในกระเพาะปัสสาวะของไก่ที่ได้ป้อนเข้าไปก่อนหน้านี้ มีจำนวนลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และกรดแลคติกได้ผลดีที่สุด (Byrd et al., 2001)

ในประเทศไทย ได้มีการศึกษาในเรื่องประสิทธิภาพของกรดอินทรีย์รวมในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากสัตว์จำนวน 79 เชื้อ *in vitro* พบว่าความเข้มข้น 1:250 สารละลายกรดอินทรีย์ที่ประกอบด้วย กรดซิตริก แลคติก และโพรปิโอนิก มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อซาลโมเนลลาจำนวน 10^6 - 10^7 cfu/มิลลิลิตร (มล.) ในแต่ละเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ (100%) ภายในเวลา 60 นาที (วารีและคณะ, 2002) นอกจากนี้ยังมีการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการใช้กรดอินทรีย์ผสมลงในน้ำดื่มในระดับ 50-100 ppm ให้ไก่กินทุกวัน ช่วยในการป้องกันและขจัดเชื้อซาลโมเนลลาออกจากร่างกายได้ดีกว่าไก่ที่ไม่ใช้กรดอินทรีย์ และเป็นผลต่อเนื่องให้ประสิทธิภาพการผลิตของไก่กระทุงในด้านน้ำหนักตัวเฉลี่ยที่อายุ 30-40 วัน ของไก่ ดีกว่ากลุ่มที่ไม่ใช้กรดอินทรีย์ (จารึก และคณะ, 2002) การทดลองครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะใช้ส่วนผสมของกรดอินทรีย์บางชนิดที่มีราคาไม่แพงมาใช้ควบคุมโรคซาลโมเนลโลซิสในไก่กระทุง ในสภาพการเลี้ยงไก่ที่เป็นแบบเดียวกับเกษตรกรส่วนใหญ่ภายในประเทศ ทดแทนการใช้สารเคมีและสารปฏิชีวนะอื่นๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อแบคทีเรีย

เชื้อที่ใช้ป้อนไก่ คือ *Salmonella Enteritidis* (nal^r) ซึ่งต้านต่อกรดนาลิดีซิก (nalidixic acid resistance-nal^r) ได้รับจากภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เก็บใน stock agar ที่อุณหภูมิห้อง จาก stock agar นำมาเพาะใน tryptic soy agar 2 ถึง 3 ครั้ง แล้วจึงมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ brain heart infusion บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชม. จึงนำมาเจือจางด้วย 0.85% NaCl ให้มีความเข้มข้นประมาณ 10^8 cfu/ มล.

ไก่ทดลอง

ลูกไก่กระทุงอายุ 1 วัน คณะแพศ จำนวน 360 ตัว เลี้ยงในกรงลดตายายกพื้นกรงละ 30 ตัวในตึกสัตว์ทดลองของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่มใหญ่กลุ่มละ 180 ตัว คือ กลุ่มควบคุมไม่ให้เชื้อและกลุ่มทดลองให้เชื้อ แต่ละกลุ่มแบ่งอีก 3 กลุ่ม คือ

(1) กลุ่มควบคุมไม่ให้เชื้อแบ่งเป็น

กลุ่มที่ 1 ไม่ให้เชื้อ *S. Enteritidis* และให้กรดอินทรีย์ ความเข้มข้น 1:1000

กลุ่มที่ 2 ไม่ให้เชื้อ *S. Enteritidis* และให้กรดอินทรีย์ ความเข้มข้น 1:2000

กลุ่มที่ 3 ไม่ให้เชื้อ *S. Enteritidis* และไม่ให้อินทรีย์

(2) กลุ่มทดลองให้เชื้อแบ่งเป็น

กลุ่มที่ 4 ให้เชื้อ *S. Enteritidis* และให้กรดอินทรีย์ ความเข้มข้น 1:1000

กลุ่มที่ 5 ให้เชื้อ *S. Enteritidis* และให้กรดอินทรีย์ ความเข้มข้น 1:2000

กลุ่มที่ 6 ให้เชื้อ *S. Enteritidis* และไม่ให้อินทรีย์ โดยแต่ละกลุ่มมีไก่ 60 ตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยละ 30 ตัวเลี้ยงแยกกรง กลุ่มที่ไม่ให้เชื้อแยกเลี้ยงคนละห้องกับกลุ่มให้เชื้อ

วิธีการทดลอง

ลูกไก่ได้รับน้ำ หรือกรดอินทรีย์ผสมน้ำให้กินตั้งแต่วันแรกที่มาถึงคอกสัตว์ทดลองจนสิ้นสุดการทดลอง ส่วนผสมของกรดอินทรีย์ที่ให้ประกอบด้วย กรดซิตริก 25% (w/v) กรดแลคติก 25% (v/v) กรดแอสคอบิก 10% (w/v) และกรดโพรปิโอนิก 2% (v/v) ผสมในน้ำประปาตามอัตราส่วนข้างต้น เปลี่ยนน้ำและน้ำผสมกรดอินทรีย์ที่ให้ไก่กินทุกวัน การให้อาหาร ให้กินอาหารสำเร็จรูปไม่จำกัดเหมือนกันทุกกลุ่ม จัดบันทึกจำนวนอาหารที่กินทุกวัน ก่อนทำการทดลองให้เชื้อ สุ่มตัวอย่างสวอปอุจจาระจากทวารร่วมลูกไก่ กลุ่มละ 12 ตัว (กลุ่มย่อยละ 6 ตัว) รวม 72 ตัว จาก 360 ตัว เมื่อลูกไก่อายุ 3 วัน พร้อมทั้งป้อนเชื้อ *S. Enteritidis* ที่มีปริมาณ 6×10^8 cfu/มล. ให้ลูกไก่กลุ่มที่ 4, 5 และ 6 ทุกตัว ด้วยวิธีสอดท่อ polyethylene เข้าไปในลำคอจนถึงกระเพาะปัสสาวะ 0.3 มล.

หลังการทดลองให้เชื้อ ตรวจแยกเชื้อในตัวอย่างจากไก่ทั้ง 6 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว (กลุ่มย่อยละ 5 ตัว) ทั้งหมด 60 ตัว นำมาทำลายด้วยวิธีดิงค็อก แล้วเก็บอวัยวะรวม (ตับ ม้าม และ

หัวใจ) และสวอปอุจจาระ รวมตัวอย่างทดสอบแต่ละครั้ง 120 ตัวอย่าง ทำการตรวจทั้งหมด 4 ครั้ง ที่อายุ 10, 20, 30 และ 40 วัน ในระยะเวลาเดียวกัน จดบันทึกน้ำหนักไก่ 14-15 ตัว จากทุกกลุ่มย่อย หรือ 28-30/60 ตัว

การเพาะแยกเชื้อ

เพาะแยกเชื้อ ซาลโมเนลลา โดยวิธีของ De Smedt และคณะ (1986) นำตัวอย่างอุจจาระรวม (ตับ ม้าม และหัวใจ) ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ประมาณ 1 กรัม เพาะลงใน buffer peptone water (BPW) ซึ่งเป็น pre-enrichment media 9 มล. ถ้าเป็นตัวอย่างสวอปอุจจาระเพาะลงใน BPW 4 มล. บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วคูลน้ำในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ BPW 150 ไมโครลิตร มาถ่ายลงใน modified semi-Rappaport Vassiladis (MSRV) เป็น enrichment media นำไปบ่มที่ 42°C 18-48 ชั่วโมง แล้วเลือกตัวอย่างโคโลนีที่สงสัยเพาะลงใน selective media คือ xylose lysine desoxycholate (XLD) ที่ผสมกรดนาลิซิดิก 25 ไมโครกรัม/มล (การตรวจเชื้อ ซาลโมเนลลาในลูกไก่ ก่อนป้อนเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อ XLD จะไม่ผสมกรดนาลิซิดิก) จากนั้นนำมาบ่มที่ 37°C 18-48 ชั่วโมง นำโคโลนีสีชมพูตรงกลางมีสีดำที่สงสัยมาทดสอบใน triple sugar iron (TSI) และ lysine iron agar (LIA) บ่มที่ 37°C 18-24 ชั่วโมง เชื้อที่สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลกลูโคส สร้างก๊าซไฮโดรเจนไดซัลไฟด์ ใน TSI และให้ผลบวกใน LIA เป็นเชื้อที่สงสัยว่าเป็นเชื้อซาลโมเนลลา จึงนำมาทดสอบยืนยันด้วย Salmonella O polyvalent กลุ่มรวม A ถึง 67 และซีโรกรุ๊ปจำเพาะกลุ่มต่างๆ คือ B C D E และ G โดยดูผลจากปฏิกิริยาจับกลุ่ม agglutination และซีโรกรุ๊ป D จะเป็นกลุ่มจำเพาะของ S. Enteritidis

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS version 9.0 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลา และเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อออกจากร่างกาย (คำนวณจาก 100-จำนวนร้อยละของตัวอย่างสวอปอุจจาระที่ตรวจพบเชื้อ) ในระหว่างกลุ่มควบคุมไม่ให้เชื้อ และกลุ่มทดลองให้เชื้อ โดยการทดสอบ Chi-square วิเคราะห์ข้อมูลของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (average daily weight gain-ADG) และอัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio - FCR) โดยวิธี analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในระหว่างกลุ่มควบคุมไม่ให้เชื้อ (กลุ่ม 1, 2 และ 3) และกลุ่มทดลองให้เชื้อ (กลุ่ม 4, 5 และ 6) ด้วยวิธี Duncan Multiple Range

ผลการทดลอง

ผลของกรดอินทรีย์ในการป้องกันและจัดเชื้อซาลโมเนลลา

ก่อนเริ่มการทดลอง ปรากฏว่าพบเชื้อซาลโมเนลลาซีโรกรุ๊ปต่างๆ คือ B และ C ในลูกไก่ทั้ง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมไม่ให้เชื้อ (กลุ่ม 1, 2 และ 3) และกลุ่มทดลองให้เชื้อ (4, 5 และ 6) หลังจากป้อนเชื้อในกลุ่มทดลองให้เชื้อแล้ว ผลการตรวจเชื้อซาลโมเนลลา จากตัวอย่างอุจจาระรวม และสวอปอุจจาระลูกไก่ทุกกลุ่ม ที่อายุ 10, 20, 30 และ 40 วัน และการจัดเชื้อแสดงในตารางที่ 1 และ 2 เมื่อเปรียบเทียบจำนวนร้อยละของการพบเชื้อ ในกลุ่มควบคุมไม่ให้เชื้อ ซึ่งอาจเป็นการติดเชื้อมาจาก vertical transmission หรือสิ่งแวดล้อม ได้แก่ กรง น้ำ และอาหาร เป็นต้น พบว่า กลุ่มที่ 2 มีอัตราการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาสูงกว่า กลุ่ม 1 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญเมื่ออายุ 10 และ 20 วัน แต่หลังจากนั้นตรวจพบเชื้อไม่แตกต่างกันทั้ง 3 กลุ่ม ที่อายุ 30 และ 40 วัน ($p>0.05$) เช่นเดียวกับผลการจัดเชื้อซาลโมเนลลาออกจากร่างกายที่ได้จากการวิเคราะห์ผลของการตรวจสวอปอุจจาระเพียงอย่างเดียว กลุ่ม 2 จัดเชื้อได้ต่ำกว่า กลุ่ม 1 และ 3 ที่อายุ 10 และ 20 วัน ส่วนไก่ที่อายุ 30 และ 40 วัน จัดเชื้อได้ไม่ต่างกันทั้ง 3 กลุ่ม (ตารางที่ 1) ส่วนในกลุ่มทดลองให้เชื้อ เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจพบเชื้อ และผลการจัดเชื้อ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในระหว่างกลุ่มที่ 4, 5 และ 6 ที่อายุ 10, 20 และ 30 วัน แต่แตกต่างกันเมื่ออายุ 40 วัน เฉพาะกลุ่มที่ 4 ต่างจากกลุ่มที่ 6 นั่นคือ ไก่กลุ่มที่ให้เชื้อและให้กรดอินทรีย์เจือจาง 1:1000 ตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลา น้อยกว่ากลุ่มที่ให้เชื้อและไม่ให้กรด 5% เทียบกับ 35% และสามารถจัดเชื้อได้ออกจากร่างกายได้มากกว่ากลุ่มดังกล่าว 90% เทียบกับ 40% ($p<0.05$) แต่กลุ่มที่ให้เชื้อและให้กรดเจือจาง 1:2000 ตรวจพบเชื้อ และจัดเชื้อไม่ต่างจากกลุ่มที่ให้เชื้อและไม่ให้กรดทางสถิติ (ตารางที่ 2)

ผลของกรดอินทรีย์ต่อสมรรถภาพการผลิต

เปรียบเทียบ ADG และ FCR ในระหว่างกลุ่มควบคุมไม่ให้เชื้อ (กลุ่ม 1, 2 และ 3) ตั้งแต่เริ่มทดลองจนสิ้นสุดการทดลอง พบว่า ไม่ต่างกันทางสถิติ เช่นเดียวกับกลุ่มให้เชื้อ (กลุ่ม 4, 5 และ 6) แต่ทั้งสองกลุ่ม ไก่ที่ให้กรดอินทรีย์ (ทั้ง 1:1000 และ 1:2000 รวมกัน) ADG มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มไม่ให้กรด และ FCR ก็มีแนวโน้มต่ำกว่ากลุ่มไม่ให้กรดเมื่อสิ้นสุดการทดลองในช่วงอายุ 31-40 วัน ซึ่งผลการทดลองนี้ เป็นไปในทำนองเดียวกับกลุ่มทดลองให้เชื้อ (กลุ่ม 4, 5 และ 6) แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 1 แสดงการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาในไก่กลุ่มควบคุมไม่ให้เชื้อ กลุ่ม 1, 2 และ 3 เปรียบเทียบกันที่อายุ 10, 20, 30 และ 40 วัน

อายุ (วัน)	กลุ่ม	จำนวนไก่	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ						การกำจัดเชื้อ ^C (%)
			อวัยวะ	(%)	สวอป	(%)	รวม	(%)	
			รวม						
10	1	10	3	30	3	30	6/20	30 ^B	70 ^B
	2	10	8	80	9	90	17/20	85 ^A	10 ^A
	3	10	3	30	3	30	6/20	30 ^B	70 ^B
20	1	10	3	30	4	40	7/20	35 ^B	60 ^B
	2	10	3	30	9	90	12/20	60 ^A	10 ^A
	3	10	1	10	3	30	4/20	20 ^B	70 ^B
30	1	10	1	10	2	20	3/20	15	80
	2	10	3	30	6	60	9/20	45	40
	3	10	1	10	7	70	8/20	40	30
40	1	10	1	10	4	40	5/20	25	60
	2	10	0	0	3	30	3/20	15	70
	3	10	0	0	3	30	3/20	15	70

^{AB}มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

^Cคำนวณจาก 100 -จำนวนร้อยละของตัวอย่างสวอปอุจจาระที่ตรวจพบเชื้อ

ตารางที่ 2 แสดงการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาในไก่กลุ่มให้เชื้อ กลุ่ม 4, 5 และ 6 เปรียบเทียบกันที่อายุ 10, 20, 30 และ 40 วัน

อายุ (วัน)	กลุ่ม	จำนวนไก่	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ						การกำจัดเชื้อ ^C (%)
			อวัยวะ	(%)	สวอป	(%)	รวม	(%)	
			รวม						
10	4	10	9	90	9	90	18/20	90	10
	5	10	8	80	7	70	15/20	75	30
	6	10	9	90	9	90	18/20	90	10
20	4	10	9	90	3	30	12/20	60	70
	5	10	6	60	6	60	12/20	60	40
	6	10	8	80	8	80	16/20	80	20
30	4	10	2	20	3	30	5/20	25	70
	5	10	3	30	2	20	5/20	25	80
	6	10	2	20	5	50	7/20	35	50
40	4	10	0	0	1	10	1/20	5 ^A	90 ^A
	5	10	0	0	2	20	2/70	10	80
	6	10	0	10	6	60	7/20	35 ^B	40 ^B

^{AB}มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

^Cคำนวณจาก 100 -จำนวนร้อยละของตัวอย่างสวอปอุจจาระที่ตรวจพบเชื้อ

ตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน และอัตราแลกเปลี่ยนของไก่กลุ่มที่ให้กรดอินทรีย์ และไม่ใหกรดในช่วงอายุต่างๆ

	อายุ (วัน)	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น/วัน (กรัม) $\pm$ SD		อัตราแลกเปลี่ยน $\pm$ SD	
		ใหกรด	ไม่ใหกรด	ใหกรด	ไม่ใหกรด
ไม่ได้ใหเชื้อ	3-10	14.05 $\pm$ 0.89	14.89 $\pm$ 0.12	1.65 $\pm$ 0.11	1.55 $\pm$ 0.02
	11-20	25.98 $\pm$ 1.26	26.58 $\pm$ 0.80	2.41 $\pm$ 0.35	2.19 $\pm$ 0.18
	21-30	54.18 $\pm$ 1.75	56.50 $\pm$ 2.78	1.83 $\pm$ 0.06	1.76 $\pm$ 0.06
	31-40	85.47 $\pm$ 5.43	81.74 $\pm$ 13.00	1.76 $\pm$ 0.15	1.95 $\pm$ 0.14
ใหเชื้อ	3-10	14.04 $\pm$ 0.42	13.30 $\pm$ 0.35	1.66 $\pm$ 0.05	1.78 $\pm$ 0.08
	11-20	26.69 $\pm$ 1.36	25.83 $\pm$ 0.17	2.24 $\pm$ 0.06	2.32 $\pm$ 0.01
	21-30	52.35 $\pm$ 2.93	54.73 $\pm$ 0.38	1.81 $\pm$ 0.10	1.80 $\pm$ 0.01
	31-40	82.59 $\pm$ 4.72	73.06 $\pm$ 3.87	1.84 $\pm$ 0.10	2.01 $\pm$ 0.18

วิจารณ์

การทดลองครั้งนี้มีปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้ คือ เชื้อซาลโมเนลลาซีโรกรูปอื่นๆ ที่แยกได้ระหว่างการเลี้ยง ผลการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาซีโรกรูปต่างๆ ในไก่ทุกกลุ่มเมื่ออายุ 3 วัน ก่อนเริ่มการทดลอง แสดงให้เห็นว่า เชื้อดังกล่าวอาจติดมากับกรงไก่ หรืออาหารที่นำมาเลี้ยงหรือจาก vertical transmission ดังนั้น ในกลุ่มควบคุมไม่ให้เชื้อ (กลุ่มที่ 1, 2 และ 3) จึงสามารถตรวจแยกเชื้อเหล่านี้ได้ทุกครั้งที่สุ่มตรวจ ซึ่งกลุ่มที่ 2 มีอัตราการตรวจพบเชื้อ สูงกว่ากลุ่มที่ 1 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ที่อายุ 10 วัน และ 20 วัน จึงมีความเป็นไปได้ว่า จำนวนของเชื้อที่ลูกไก่ กลุ่มที่ 2 ได้รับอาจมีปริมาณมากกว่า กลุ่ม 1 และ 3 หรืออาจมีการปนเปื้อนในขั้นตอนการเพาะแยกเชื้อ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง อัตราการพบเชื้อของทุกกลุ่มลดลง ซึ่งไม่อาจสรุปได้ว่าการลดลงของอัตราพบเชื้อที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติมาจากประสิทธิภาพของกรดอินทรีย์ เนื่องจากไม่รู้ปริมาณเชื้อที่แต่ละกลุ่มรับเข้าไป ทั้งก่อนและหลังให้กรดอินทรีย์ เช่นเดียวกับ กลุ่มทดลองให้เชื้อ (กลุ่มที่ 4, 5 และ 6) แม้จะรู้ปริมาณแน่นอนของ *S. Enteritidis* (nal^r) ที่ใหภายหลัง ก็ไม่สามารถประเมินผลเฉพาะ *S. Enteritidis* ได้ โดยเหตุที่การสุ่มโคลนิจาอาหาร XLD เพื่อยืนยันซีโรกรูป D อาจไม่ครอบคลุมถึง *S. Enteritidis* ทุกครั้ง การทดลองครั้งนี้จึงได้ทำการประเมินผลการติดเชื้อซีโรกรูปรวม ทั้งการติดเชื้อซีโรกรูปก่อนปนเชื้อและซีโรกรูปที่ปนมาให้ใกล้เคียงกัน

จากผลการตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาจากอวัยวะรวม และสวอปอุจจาระไก่อของกลุ่ม 4, 5 และ 6 ตั้งแต่อายุ 10, 20

และ 30 วัน ที่ไม่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากลูกไก่บางตัว ที่ติดเชื้อมาก่อนที่จะให้กรดอินทรีย์ได้รวมกลุ่ม (colonize) ในลำไส้ แล้วจึงรุกล้ำสู่ระบบ คือ อวัยวะภายใน โดยเฉพาะตับและม้าม ก่อน (Soerjadi et al., 1981; Spencer and Garcia, 1995) จึงไม่ถูกยับยั้งด้วยกรดอินทรีย์ โดยปกติ ไก่ที่ติดเชื้อซาลโมเนลลาเมื่ออายุน้อย การตรวจพบเชื้อจะลดลงหลังอายุ 3 สัปดาห์ เมื่อ microflora ในลำไส้ไก่ได้พัฒนาขึ้นมาแย่งที่และรวมกลุ่มกัน ขับเชื้อซาลโมเนลลาออก ในเวลาเดียวกันไก่เริ่มมีแอนติบอดีต่อเชื้อ ซึ่งจะขึ้นสูงสุด 3-4 สัปดาห์หลังให้เชื้อด้วย เป็นกลไกธรรมชาติ (Seuna, 1978; Hassan et al., 1990) จากการทดลองเมื่อไก่อายุ 40 วัน การตรวจพบเชื้อจากสวอปอุจจาระในกลุ่มทดลองให้เชื้อและให้กรด (กลุ่มที่ 4 และ 5) น้อยลงอย่างเห็นได้ชัดกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ให้กรด (กลุ่ม 6) ซึ่งผลการตรวจจากตัวอย่างสวอปนี้ เป็นข้อบ่งชี้ถึงความสามารถในการกำจัดเชื้อก่อโรคออกจากร่างกาย (exclusion) (Soerjadi et al., 1981) โดยที่กลุ่มให้กรด 1:1000 สามารถกำจัดเชื้อออกจากร่างกาย (90%) ได้มากกว่ากลุ่มไม่ใหกรด (40%) ในทำนองเดียวกัน กลุ่มที่ใหกรด 1:1000 สามารถลดจำนวนไก่ที่ตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลา (5%) ได้มากกว่ากลุ่มไม่ใหกรด (35%) อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของจารึกและคณะ (2002)

ในสัตว์ปีก เป็นที่ทราบกันว่า เชื้อก่อโรค เช่น ซาลโมเนลลา ผ่านเข้าสู่ทางเดินอาหารทางกระเพาะพัก ซึ่งเป็นอีกแหล่งหนึ่งของการปนเปื้อนเชื้อซาลโมเนลลาในซากไก่นอกจากไส้ตัน (Hargis et al., 1995) กรดอินทรีย์ที่ผสมในอาหารให้

ไก่กิน จะออกฤทธิ์ในบริเวณทางเดินอาหารส่วนต้น คือ กระเพาะพัก และกิน พิสูจน์ได้จากการตรวจพบกรดอินทรีย์ที่ประกอบด้วยกรดโปรปิโอนิก และกรดฟอร์มิกในปริมาณสูง เฉพาะที่นี้ภายหลังการทดลองผสมในอาหารให้ไก่กิน (Thompson and Hinton, 1997) และยังพบว่า สามารถลด อัตราการป่วย อัตราการตาย และลดจำนวนเชื้อที่เข้าสู่ตับของ การทดลองให้ติดเชื้อ *S. Gallinarum* ได้ด้วย (Berchieri and Barrow, 1996) นอกจากนี้ Barnhart และคณะ (1999) ได้ รายงานประสิทธิภาพของกรดซिटริกผสมกับ d-Limonene ให้ ไก่อายุ 8 สัปดาห์กิน มีผลลดจำนวนซาลโมเนลลาใน กระเพาะพัก เช่นเดียวกับการให้กรดแลกติก 0.5% ผสมน้ำ ให้ไก่กิน ในช่วง 8-12 ชั่วโมง ก่อนส่งโรงฆ่า สามารถลดจำนวน ซาลโมเนลลาและแคมไพโลแบคเตอร์ในกระเพาะพัก เมื่อ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมได้ (Byrd et al., 2001) โดยเหตุที่ กรดแลกติกไปลด pH และอาจเป็นแหล่งของธาตุคาร์บอนซึ่ง จำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียที่พบปกติใน กระเพาะพัก (Byrd et al., 2001) ดังนั้น จากการทดลองครั้ง นี้อาจสรุปได้ว่า กรดอินทรีย์ไม่มีผลในการลดจำนวนไก่ที่ ตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาที่เข้าไปรวมกลุ่มแล้วก่อนการให้ กรดอินทรีย์โดยเฉพาะในลูกไก่อายุน้อยดังเช่นผลการทดลอง ในกลุ่มควบคุมไม่ให้เชื้อ แต่มีความเป็นไปได้ว่า มีผลในการ ยับยั้งและลดจำนวนไก่ที่ตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาที่เข้าไป ภายหลังจากการให้กรดอินทรีย์ผสมในน้ำให้กิน

เมื่อเปรียบเทียบสมรรถภาพการผลิต ไก่กลุ่มที่กินกรด อินทรีย์ทั้งที่ได้รับเชื้อและไม่ได้รับเชื้อ ADG มีแนวโน้มสูงกว่า ไก่กลุ่มที่ไม่ได้ให้กรด ในช่วงอายุ 31-40 วัน และ FCR ต่ำ กว่า ได้ผลไปในทำนองเดียวกับการทดลองของจารึกและคณะ (2002) ซึ่งเป็นข้อดีประการหนึ่ง แต่ข้อดีประการสำคัญที่สุด คือสามารถลดจำนวนไก่ที่ตรวจพบเชื้อซาลโมเนลลาลงได้ นอกจากนี้ ส่วนผสมของกรดอินทรีย์รวมที่ใช้ ได้แก่ กรดซิทริก แลคติก และแอสคอบิก เป็นสารออกฤทธิ์ในการทำลายและมึ ความปลอดภัยสูง เป็นพืชตำและไม่เป็นสารก่อมะเร็ง (Sofos and Busta, 1992) ส่วนประกอบทั้งหมดจะเสื่อมสลายโดย ขบวนการชีวภาพ จึงไม่ก่อให้เกิดการตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม (Harvey, 1985)

อนึ่ง การทดลองครั้งนี้ยังมีข้อจำกัดเรื่องสถานที่เลี้ยง ไก่กับแคบ ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเครียดต่อสัตว์ ทำให้มีผลต่อ การเจริญเติบโต ADG และ FCR จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม ทำการทดลองในภาคสนามที่คาดว่าจะได้ผลของสมรรถภาพ การผลิตชัดเจนกว่านี้ และเพื่อยืนยันผลการลดจำนวนเชื้อก่อ

โรคที่ติดโดยธรรมชาติระหว่างการเลี้ยง ให้ได้ข้อสรุปสามารถ นำสารละลายกรดอินทรีย์ไปใช้ประโยชน์จริงในอุตสาหกรรม การเลี้ยงไก่แทนสารเคมีหรือสารปฏิชีวนะอื่นๆ ได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ บริษัท เบ็ทเทอร์ฟาร์ม จำกัด ที่ได้ให้งบประมาณเพื่อสนับสนุนการทดลองครั้งนี้ และขอ ขอบคุณ รองศาสตราจารย์ อัจฉรา รัชสิน ที่ช่วยวิเคราะห์ข้อมูล และบุคลากรของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่ช่วยให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- จารึก ญัฐกรกุล สุภาพ กำลังแพทย์ สมจิตร กันธารม ธิติมา ไตรพิพัฒน์ และเกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2002. (2545). ประสิทธิภาพของกรดอินทรีย์ (Bioclean™) ต่อการเจริญเติบโตและการขจัดเชื้อ *Salmonella* ในไก่กระທး: 1. ประสิทธิภาพของกรดอินทรีย์ในการขจัดเชื้อ *Salmonella* ในไก่กระທး. ประมวลรายงานการสัมมนา ทางวิชาการ เรื่อง เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อพัฒนาเกษตรกรรม ไทย สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตกาฬสินธุ์ 23-24 พฤษภาคม ณ โรงแรมริมปาว กาฬสินธุ์ หน้า 36-43.
- วาริ นิยมธรรม อินทรา กระหม่อมทอง และเกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2002. (2545). ประสิทธิภาพของสารละลายกรดอินทรีย์ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์. ประมวลรายงาน การสัมมนาทางวิชาการ เรื่องเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อการ พัฒนาเกษตรกรรมไทย จัดโดย สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตกาฬสินธุ์ 23-24 พฤษภาคม ณ โรงแรม ริมปาว กาฬสินธุ์ หน้า 63-68.
- Barnhart, E.T., Sarlin, L.L., Caldwell, D.J., Byrd, J.A., Corrier, D.E. and Hargis, B.M. 1999. Evaluation of potential disinfectants for preslaughter broiler crop decontamination. *Poult. Sci.* 78 : 32-37.
- Berchieri, A. Jr. and Barrow, P.A. 1996. Reduction in incidence of experimental fowl typhoid by incorporation of a commercial formic acid preparation (Bio-Add™) into poultry feed. *Poult. Sci.* 75 : 339-341.

- Byrd, J.A., Hargis, B.M., Caldwell, D.J., Bailey, R.H., Herron, K. L., McReynolds, J.L., Brewer, R.L., Anderson, R. C., Bischoff, K. M., Callaway, T.R. and Kubena, L.F. 2001. Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of broilers. *Poult. Sci.* 80 : 278-283.
- Canibe, N., Engberg, R.M. and Jensen B.B. 2001. "An overview of the effect of organic acids on gut flora and gut health." [Online] Available : http://www-afac.slu.se/Workshop%20Norge/organic_acids_canibe_et_al.pdf
- De Smedt, J.M., Bolderdijk, R.F. and Rappold, H. 1986. Rapid *Salmonella* detection in food by motility enrichment on a Modified semi - solid Rappaport - Vassiliadis medium. *J. Food Prot.* 49 : 510-514.
- Guard, J. and Petter, J. 2001. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environ. Microbiol.* 3 : 421-430.
- Hargis, B.M., Caldwell, D.J., Brewer, R.L., Corrier, D.E. and Deloach, J.R. 1995. Evaluation of chicken crop as a source of *Salmonella* contamination of broiler carcasses. *Poult. Sci.* 74 : 1548-1552.
- Harvey, S.C. 1985. Antiseptics and disinfectants. In : Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 7th ed. New York: Macmillan Publishing Company. 961.
- Hassan, J.O., Barrow, P.A., Mockett, A.P.A. and Mcleod, S. 1990. Antibody response to experimental *Salmonella typhimurium* infection in chickens measured by ELISA. *Vet. Rec.* 126 : 519 -522.
- Malbak, K., Gerner - Smidt, P. and Wegener, H.C. 2002. Increasing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Emerg. Infect. Dis.* 8 : 514 - 515.
- Misher, B., Griffin, P.M., Tauxe, R.V., Cameron, D.N., Hutcheson, R.M. and Schaffaree, W. 1991. *Salmonella enteritidis* gastroenteritis transmitted by intact chicken eggs. *Ann Intern. Med.* 155 : 190 -194.
- Rose, B.E., Hill, W.E., Umholtz, R., Ransom. G.M. and James, W.O. 2002. Testing for *Salmonella* in raw meat and poultry products collected at federally inspected establishments in the United States. 1998 Through 2000. *J. Food Prot.* 65 : 937-47.
- Seuna, E. 1979. Sensitivity of young chickens to *Salmonella typhimurium* var. *copenhagen* and *S. infantis* infection and the preventive effect of cultured intestinal microflora. *Avian Dis.* 23 : 392-400.
- Spencer, J.L. and Garcia, M.M. 1995. Resistance of chicks and poults fed vermicompost to caecal colonization by *Salmonella*. *Avian Patho.* 24 : 157-170.
- Soerjadi, A.S., Stehman, S.M., Snoeyenbos, G.H., Weinack, O.M. and Smyser, C.F. 1981. Some measurements of protection against paratyphoid *Salmonella* and *Escherichia coli* by competitive exclusion in chickens. *Avian Dis.* 25 : 706-712.
- Sofos, J.N. and Busta, F.F. 1992. Chemical Food Preservatives. In : Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. 2nd ed., London : Blackwell Scientific Publication. 361-363.
- Thompson, J.L. and Hinton, M. 1997. Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on salmonellas in the crop. *British Poult. Sci.* 38 : 59-65.
- Varavithya, W., Vathanophas, K., Bondhedatta, L., Punyaratabandhu, P., Sangchai, R., Athipanyakom, S., Wasi, C. and Echerverria, P. 1990. Importance of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in the etiology of diarrhal disease among children less than 5 years of age in a community in Bangkok, Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 28 : 2507-2510