บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากมูลลูกสุกร

เลือกเก็บมูลสุกรที่สดใหม่จากลูกสุกรอายุประมาณ 10-60 วันในแหล่งต่าง ๆ จำนวน 250 ตัวอย่าง ได้แก่ ฟาร์มสุกรจังหวัดตรัง จำนวน 100 ตัวอย่าง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 80 ตัวอย่าง และจากคณะเกษตรศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตนครศรีธรรมราช จำนวน 70 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกโดยวิธีการ streak บนอาหาร MRS agar ที่มีการเติม เกลือน้ำดีและแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.2 เลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่มีลักษณะแตกต่างกันมาทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลสซึ่งจะให้ผลลบ และทำการย้อมสีแกรมโดยแบคทีเรียแลกติกจะติดสีแกรมบวก และมีลักษณะรูปแท่ง อาจเป็นแท่งสั้นหรือแท่งยาว หรืออาจมีรูปกลม การเรียงตัวอาจอยู่เดี่ยว ๆ เป็นคู่ เรียงตัวแบบสี่เซลล์ติดกัน หรือเรียงตัวเป็นโซ่ สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ทั้งหมด 306 สายพันธุ์ โดยลูกสุกรจากฟาร์มจังหวัดตรังจำนวน 100 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้จำนวน 101 สายพันธุ์ จากฟาร์มคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 80 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้จำนวน 87 สายพันธุ์ และจากฟาร์มของคณะเกษตรศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตนครศรีธรรมราช จำนวน 70 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้จำนวน 118 สายพันธุ์

2. การทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ

2.1 ความสามารถในการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารสุกร

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ 306 สายพันธุ์ ไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ คือความสามารถอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารสุกร ได้แก่ การทนเกลือน้ำดี การทนกรด และการเติบโตในสภาพไม่มีออกซิเจน ได้ผลดังนี้คือ

เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 306 สายพันธุ์ไปทดสอบความสามารถในการทนเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น 0.30% พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกที่สามารถทนเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น 0.30 % จำนวน 289 สายพันธุ์ คิดเป็น 94.44 % ของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่แยกได้ และเมื่อนำแบคทีเรียแลกติกจำนวน 289 สายพันธุ์ดังกล่าวไปทดสอบสมบัติการทนต่อกรดที่ระดับพีเอช 3,

4, 5 และ 6 พบว่าแบคทีเรียแลกติกทุกสายพันธุ์สามารถทนต่อความเป็นกรดที่ระดับ pH 6 มี 263 สายพันธุ์ สามารถทนต่อความเป็นกรดที่ระดับ pH 5 มี 146 สายพันธุ์ที่ทนต่อความเป็นกรดที่ระดับ pH 4 และ 81 สายพันธุ์ทนต่อความเป็นกรดที่ระดับ pH 3 จึงเลือกสายพันธุ์ที่ทนกรดที่ระดับพีเอช 3-4 ซึ่งมีจำนวน 146 สายพันธุ์ไปทดสอบต่อไป เนื่องจากระดับพีเอชในกระเพาะอาหารของลูกสุกรจะอยู่ระหว่าง 3-4 (Kidder and Mannear, 1978) เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 146 สายพันธุ์ดังกล่าวไปทดสอบการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนพบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 146 สายพันธุ์ คิดเป็น 100 % ของจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ สามารถเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนซึ่งเป็นสภาวะในระบบทางเดินอาหาร (ตารางที่ 7)

2.2 การเจริญในอาหารที่ขาดวิตามินบี 12

เนื่องจากวิตามินบี 12 เป็นวิตามินที่มีราคาแพง และเป็นสารที่มีความสำคัญในการเป็นโคเอนไซม์ในการสังเคราะห์ DNA ดังนั้นในการคัดเลือกโปรไบโอติกเพื่อเสริมในอาหารจึงต้องแน่ใจว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ต้องไม่แย่งวิตามินบี 12 ในระบบทางเดินอาหารของสุกร ซึ่งอาจทำให้สุกรขาดสารอาหารได้ เมื่อนำแบคทีเรียแลกติก 146 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 มาทดสอบการเจริญในอาหารที่ขาดวิตามินบี 12 พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่เจริญไม่ได้ 37 สายพันธุ์ และสามารถเจริญได้ในอาหารดังกล่าวจำนวน 110 สายพันธุ์ ซึ่งคิดเป็น 75.34 % ของจำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ (ตารางที่ 7)

2.3 การย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง

เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกจำนวน 110 สายพันธุ์ดังกล่าว มาทดสอบการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกที่สามารถย่อยได้เฉพาะแป้ง จำนวน 52 สายพันธุ์ สามารถย่อยโปรตีนและแป้ง จำนวน 31 สายพันธุ์ สามารถย่อยไขมันและแป้ง จำนวน 6 สายพันธุ์ ไม่สามารถย่อยทั้งโปรตีน ไขมันและแป้ง จำนวน 1 สายพันธุ์ และมีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 20 สายพันธุ์ สามารถย่อยได้ทั้งโปรตีน ไขมัน และแป้ง ซึ่งคิดเป็น 18.18% ของจำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ ซึ่งจากการทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ 306 สายพันธุ์สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีสมบัติดังกล่าวได้ทั้งสิ้น 20 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 7 และ 8

ตารางที่ 7 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ

คุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก	จำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ	จำนวนสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้	คิดเป็นร้อยละ (%)
ความสามารถในการทนเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น 0.30 %	306	289	94.44
ความสามารถในการทนกรดที่ระดับพีเอช 3-4	289	146	50.52
การเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน	146	146	100.00
ความสามารถในการเจริญในอาหารที่ขาดวิตามินบี 12	146	110	75.34
ความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง	110	20	18.18

ตารางที่ 8 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ

รหัสเชื้อ	oxgall 0.3%	pH				ความต้องการออกซิเจน		เติบโตในอาหารที่ขาดวิตามินบี 12	ความสามารถในการย่อย		
		6	5	4	3	ไม่	ต้องการ		โปรตีน	ไขมัน	แป้ง
L6, L22, L33, L35, L54, L117, L118, L154, L193, L205, L227, L246, L269, L273, L300, L305, L306 (17 สายพันธุ์)	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L7, L8, L10, L12, L13, L14, L16, L17, L19, L20, L23, L36, L53, L56, L59, L61, L79, L148, L163, L172, L182, L183, L184, L186, L191, L202 (26 สายพันธุ์)	+	+	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L3, L4, L5, L9, L11, L15, L18, L21, L25, L26, L27, L29, L30, L31, L38, L40, L45, L52, L55, L57, L58, L60, L62, L63, L66, L68, L69, L70, L71, L77, L78, L80, L81, L84, L85, L87, L89, L90, L95, L97, L98, L102, L103, L109, L111, L112, L119, L121,	+	+	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ 8 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	oxgall 0.3%	pH				ความต้องการออกซิเจน		เติบโตในอาหารที่ขาดวิตามินบี 12	ความสามารถในการย่อย		
		6	5	4	3	ไม่	ต้องการ		โปรตีน	ไขมัน	แป้ง
L122,L123, L126, L127, L131, L133, L135, L136, L137, L138, L139, L140, L141, L143, L145, L146, L149, L150, L152, L153, L155, L156, L157, L160, L161, L162, L165, L168, L170, L173, 175, L177, 178, L179, L180, L181, L185, L192, L194, L195, L196, L197, L198, L200, L212, L232, L240, L249, L252, L253, L271, L275, L278, L279, L280, L282, L283, L284, L285, L286, L287, L288, L289, L296, L298, L299, L301, L303, L304 (117 สายพันธุ์)	+	+	+	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ 8 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	oxgall 0.3%	pH				ความต้องการออกซิเจน		เติบโตในอาหารที่ขาดวิตามินบี 12	ความสามารถในการย่อย		
		6	5	4	3	ไม่	ต้องการ		โปรตีน	ไขมัน	แป้ง
L41, L43, L49, L50, L82, L83, L99, L116, L120, L147, L167, L176, L235, L242, L247, L248, L262, L264, L266, L267, L268, L270, L274, L276, L277, L302 (26 สายพันธุ์)	+	+	+	+	-	+	+	-	ND	ND	ND
L39, L88, L93, L132, L158, L190, L210, L211, L216, L225, L239, L244, L245, L254, L263, L265 (16 สายพันธุ์)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
L221, L241 (2 สายพันธุ์)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
L2, L24, L42, L44, L47, L86, L105, L187, L207, L208, L222, L223, L234, L250, L251, L255 (16 สายพันธุ์)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

ตารางที่ 8 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	oxgall 0.3%	pH				ความต้องการออกซิเจน		เติบโตในอาหารที่ขาดวิตามินบี 12	ความสามารถในการย่อย		
		6	5	4	3	ไม่	ต้องการ		โปรตีน	ไขมัน	แป้ง
L28, L76, L96, L101, L107, L114, L115, L230, L231,L295 (10 สายพันธุ์)	+	+	+	+	+	+	+	-	ND	ND	ND
L297 (1 สายพันธุ์)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
L32, L34, L37, L46, L72, L91, L92, L94, L106, L110, L128, L129, L151, L159, L166, L174, L188, L189, L199, L201, L203, L204, L206, L214, L215, L220, L229, L257, L258, L259, L261, L272, L290, L291, L292, L293 (36 สายพันธุ์)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
L67, L130, L171, L243 (4 สายพันธุ์)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
L1,L48, L51,L75, L100, L104, L108, L113, L218, L228, L236, L238, L256, L260, L294 (15 สายพันธุ์)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

ตารางที่ 8 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	oxgall 0.3%	pH				ความต้องการออกซิเจน		เติบโตในอาหารที่ขาดวิตามินบี 12	ความสามารถในการย่อย		
		6	5	4	3	ไม่	ต้องการ		โปรตีน	ไขมัน	แป้ง
[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]

+ หมายถึง สามารถเจริญเติบโต

\- หมายถึง ไม่สามารถเจริญเติบโต

ND หมายถึง ไม่ได้ทำการทดสอบ

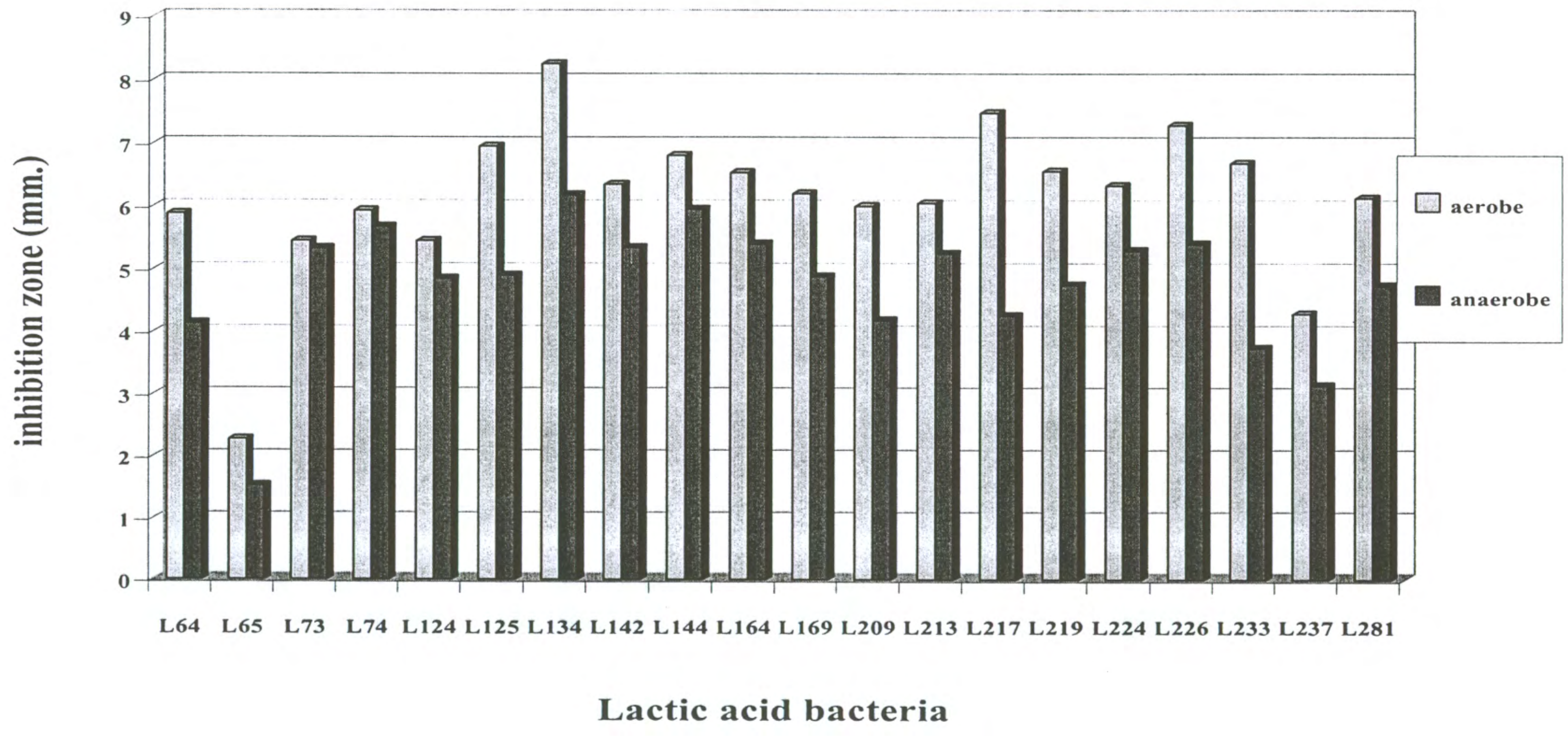
3. การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* จากลูกสุกรท้องร่วงของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

3.1 การคัดเลือก β - hemolytic *E. coli* จากมูลสุกร

จากเชื้อ *E. coli* 60 สายพันธุ์ที่แยกจากมูลสุกร (จากงานวิจัยของรศ. ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร) เมื่อนำมาทดสอบการสร้าง β – hemolysin โดยการ streak บนอาหาร blood agar พบว่าเป็นเชื้อ β - hemolytic *E. coli* เพียง 1 สายพันธุ์ ได้แก่ β - hemolytic *E. coli* 240/2 จึงนำเชื้อ *E. coli* ดังกล่าวมาใช้เป็นอินดิเคเตอร์ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญโดยโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ 20 สายพันธุ์จากข้อ 2

3.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ β – hemolytic *E. coli* 240/2 ของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก โดยวิธี agar spot

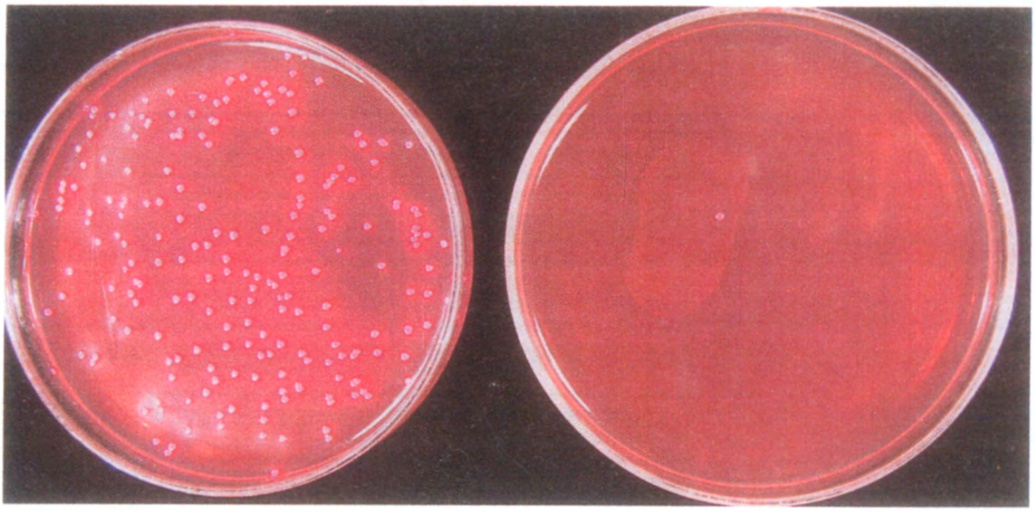
เมื่อนำโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกทั้ง 20 สายพันธุ์ซึ่งคัดเลือกได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ β - hemolytic *E. coli* 240/2 โดยวิธี agar spot พบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกทั้ง 20 สายพันธุ์ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ β - hemolytic *E. coli* 240/2 ได้ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยสามารถยับยั้งในสภาพที่มีออกซิเจนได้ดีกว่าในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน ในสภาพที่มีออกซิเจนโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก 18 สายพันธุ์มีวงใสการยับยั้งมากกว่า 5 มม. มีเพียง 2 สายพันธุ์ที่มีวงใสการยับยั้งน้อยกว่า 5 มม. สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ β - hemolytic *E. coli* 240/2 ในสภาพมีออกซิเจนได้ดีที่สุดคือ สายพันธุ์ L134 โดยมีวงใสการยับยั้ง 8.25 มม. ในขณะที่สายพันธุ์ L65 สามารถยับยั้งได้ต่ำสุดคือ มีวงใสการยับยั้งเพียง 2.28 มม. ส่วนการยับยั้งในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนมีโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกเพียง 9 สายพันธุ์ที่มีวงใสการยับยั้งมากกว่า 5 มม. และ 11 สายพันธุ์มีวงใสการยับยั้งต่ำกว่า 5 มม. สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้ง β – hemolytic *E. coli* 240/2 ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนได้สูงสุดคือ สายพันธุ์ L134 เช่นเดียวกัน โดยมีวงใสการยับยั้งเท่ากับ 6.18 มม. และสายพันธุ์ที่ยับยั้งได้ต่ำสุดคือ สายพันธุ์ L65 เช่นเดียวกับในสภาพที่มีออกซิเจนโดยมีวงใสการยับยั้งเพียง 1.53 มม. (ตารางที่ 15 ภาคผนวก, รูปที่ 4)



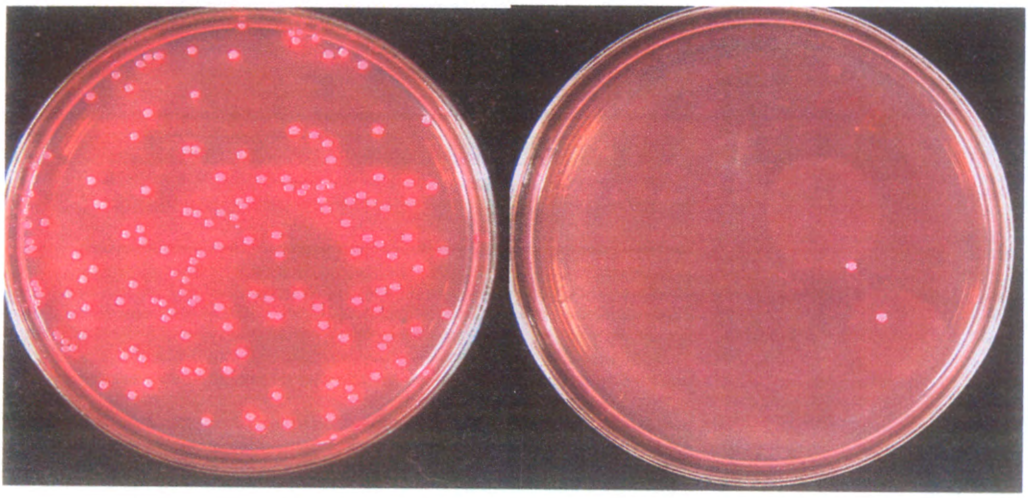
รูปที่ 4 การยับยั้งเชื้อ β - hemolytic *E. coli* 240/2 โดยวิธี agar spot ในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน

3.3 การทดสอบความสามารถการยับยั้ง β - hemolytic *E. coli* 240/2, *E. coli* K88 และ *E. coli* K99 ของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกโดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน

เมื่อนำโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกทั้ง 20 สายพันธุ์มาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง β - hemolytic *E. coli* 240/2 และ *E. coli* สายพันธุ์เปรียบเทียบซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุที่ทำให้สุกรท้องร่วงคือ *E. coli* K88 และ *E. coli* K99 โดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (รูปที่ 5) แล้วนับจำนวนเชื้อ *E. coli* ที่เหลือรอดและคำนวณร้อยละการยับยั้งของเชื้อโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก พบว่ามีโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก 20 สายพันธุ์ สามารถยับยั้ง β - hemolytic *E. coli* 240/2, *E. coli* K 88 และ *E. coli* K99 ได้ร้อยละ 58-100, 64-99 และ 64-100 ตามลำดับ โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการยับยั้งสูงสุดโดยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกันคือแบคทีเรียสายพันธุ์ L124 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ β - hemolytic *E. coli* 240/2 และ *E. coli* K 99 ได้ร้อยละ 100 และสามารถยับยั้ง *E. coli* K 88 ได้ร้อยละ 99 ส่วนโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่ยับยั้งได้ต่ำสุดคือ L73 ซึ่งสามารถยับยั้ง *E. coli* K 88 และ *E. coli* K99 ได้ร้อยละ 64 และสามารถยับยั้ง β - hemolytic *E. coli* 240/2 ได้เพียงร้อยละ 58 จำนวนสายพันธุ์ของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้ง β - hemolytic *E. coli* 240/2, *E. coli* K 88 และ *E. coli* K99 ได้เกินร้อยละ 90 มีจำนวน 9, 6 และ 9 สายพันธุ์ ตามลำดับ และมีโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกเพียง 6 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้ง *E. coli* ทั้ง 3 สายพันธุ์เกินร้อยละ 90 ซึ่งได้แก่ โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ L74, L124, L125, L134, L164 และ L281 โดยมีร้อยละการยับยั้งอยู่ระหว่าง 90-94, 99-100, 93-96, 96-100, 98-99 และ 94-98 ตามลำดับ (ตารางที่ 16 ภาคผนวก, รูปที่ 6) จึงได้คัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์ดังกล่าวไว้ศึกษาต่อไป

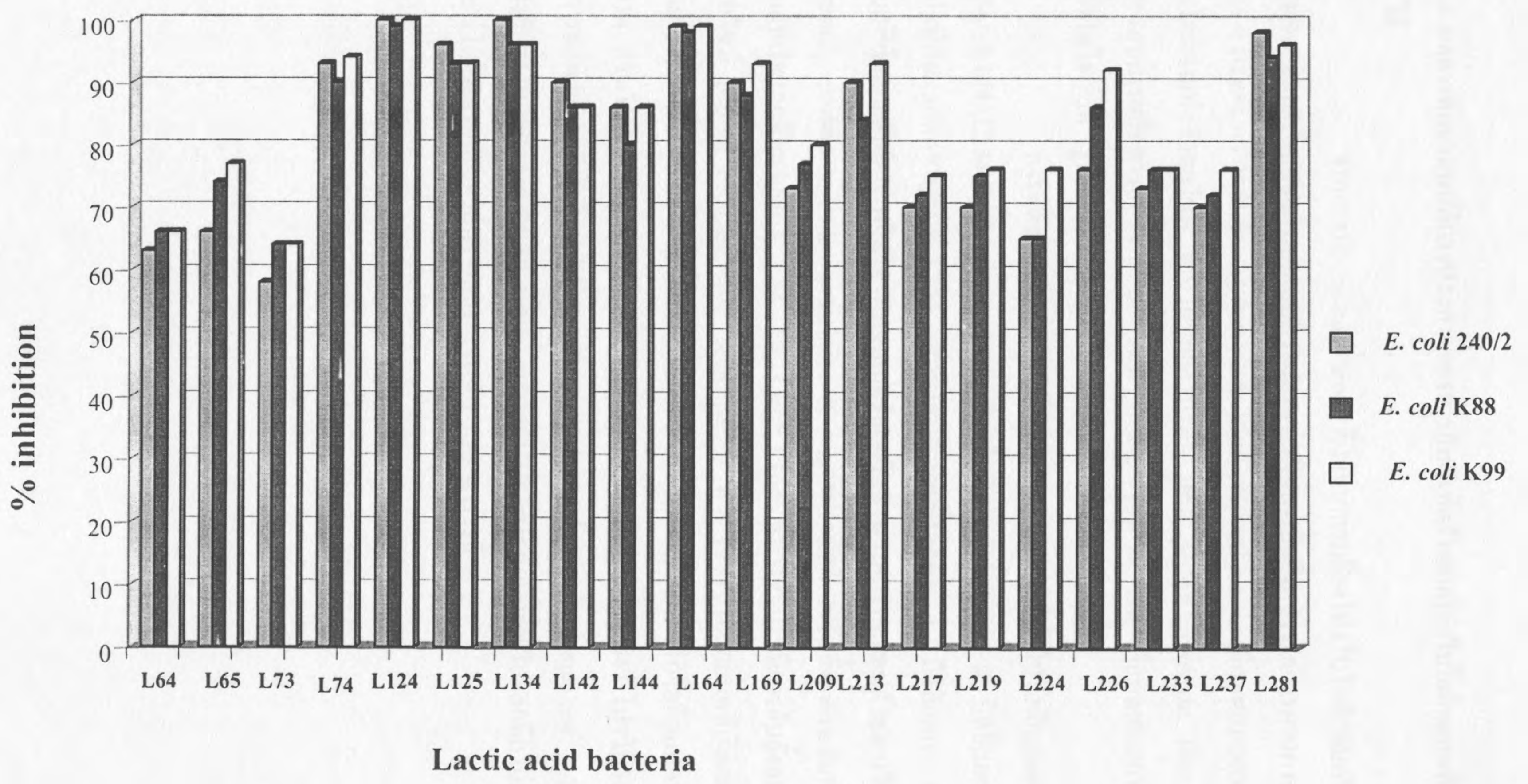


A : control (*E. coli* 240/2) B : associated culture (*E. coli* 240/2 + L 164)



C : control (*E. coli* 240/2) D : associated culture (*E. coli* 240/2 + L 281)

รูปที่ 5 การยับยั้งเชื้อ β-hemolytic *E. coli* 240/2 โดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกบนอาหาร MacConkey agar (MCA)

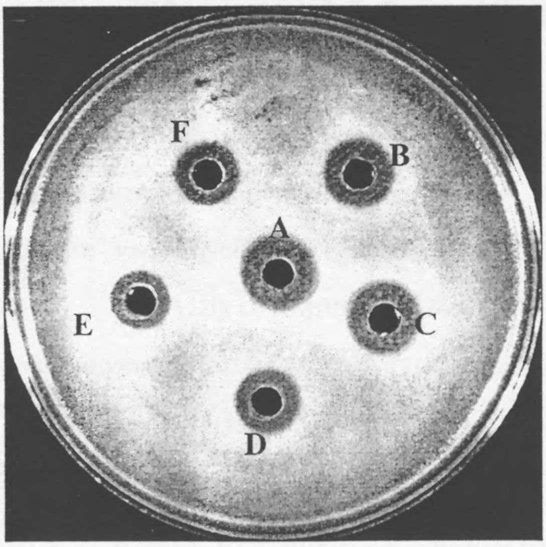


รูปที่ 6 เปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อ β-hemolytic *E. coli* 240/2, *E. coli* K88 และ *E. coli* K99 โดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกันกับโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

4. ผลการศึกษาสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่สร้างจากโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

จากการนำ culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกในอาหาร MRS ในการทดลองมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งหลังจากการผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ ที่ระดับความเข้มข้น 1 มก. ต่อ มล. ได้แก่ เอนไซม์ catalse เพื่อทดสอบการผลิตสารยับยั้งที่เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ pepsin, protease และ proteinase K เพื่อทดสอบการผลิตสารยับยั้งที่เป็นโปรตีน และเอนไซม์ amylase เพื่อทดสอบการผลิตสารยับยั้งที่เป็นคาร์โบไฮเดรต (รูปที่ 7)

การทดสอบด้วยเอนไซม์ catalase พบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ L74, L124, L134, L164 และ L281 ส่วนใสมีการยับยั้งลดลง 2 มิลลิเมตร ส่วนโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ L125 ส่วนใสมีการยับยั้งลดลง 1 มิลลิเมตร แสดงว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกมีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ส่วนการทดสอบด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ pepsin, protease และ proteinase K พบว่าส่วนใสมีการยับยั้งลดลงเช่นกัน โดยโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ L74, L125 และ L164 พบว่าส่วนใสมีการยับยั้งลดลง 2 มิลลิเมตรทั้งเอนไซม์ pepsin, protease และ proteinase K ส่วนโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก สายพันธุ์ L134 และ L281 ส่วนใสมีการยับยั้งลดลง 2, 3, 3 มิลลิเมตร และโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ L124 ส่วนใสมีการยับยั้งลดลง 2, 3, 2 มิลลิเมตร ตามลำดับ แสดงว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกมีการผลิตสารยับยั้งที่เป็นโปรตีน ส่วนการทดสอบด้วยเอนไซม์ amylase พบว่าขนาดขอบวงใสการยับยั้งไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แสดงว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกไม่มีการผลิตสารยับยั้งที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ (รูปที่ 7 และ ตารางที่ 9)



A : control; B : catalase; C : amylase; D : proteinase K; E : protease; F : pepsin

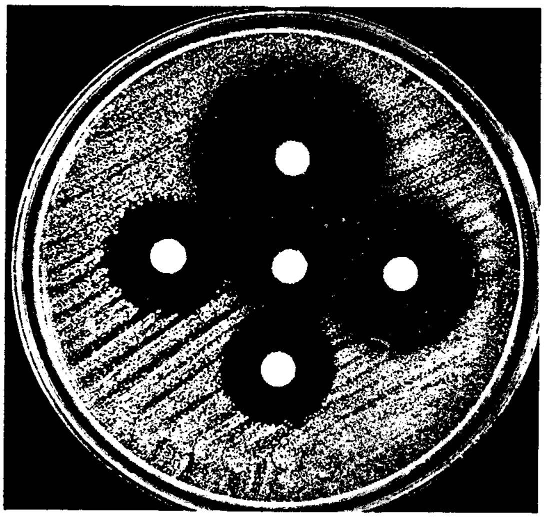
รูปที่ 7 การทดสอบสารยับยั้งของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ L124 ด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ

ตารางที่ 9 ผลของเอนไซม์ต่อสารที่สร้างขึ้นจากโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

ไอโซเลต	วงใสการยับยั้ง (มม.)					
	control	catalase	amylase	pepsin	protease	proteinase K
L74	15	13	15	13	13	13
L124	15	13	15	13	12	13
L125	15	14	15	13	13	13
L134	15	13	15	13	12	12
L164	15	13	15	13	13	13
L281	15	13	15	13	12	12

5. การทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

เมื่อนำโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จำนวน 6 สายพันธุ์ มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 14 ชนิด ได้แก่ amikacin, amoxycillin, ampicillin, chloramphinicol, erythromycin, gentamycin, kanamycin, nalidixic acid, norfloxacin, penicillin G, polymyxin B, streptomycin, tetracycline และ vancomycin โดยวิธี disc diffusion ตามวิธีของ Charteris และคณะ (1998) (รูปที่ 8) พบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกทุกสายพันธุ์ไวต่อยาปฏิชีวนะ chloramphinicol และ erythromycin และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ amikacin, nalidixic acid และ polymyxin B โดยโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ L134 ดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากที่สุดคือ 9 ชนิด L164 ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 8 ชนิด ส่วนสายพันธุ์ L124 และ L281 ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 7 ชนิด แต่มีแบบแผนการดื้อยาต่างกัน ในขณะที่ L74 และ L125 ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ 5 ชนิด และมีแบบแผนการดื้อยาที่เหมือนกันคือ ดื้อต่อยา amikacin, ampicillin, nalidixic acid, norfloxacin และ polymyxin B (ตารางที่ 10)



รูปที่ 8 การทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ L 74

ตารางที่ 10 ความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

isolates	antibiotic													
	AK	AML	AMP	C	E	G	K	NA	NOR	P	PB	S	TE	VA
L74	R	S	S	S	S	I	I	R	R	I	R	I	S	S
L124	R	S	S	S	S	I	I	R	R	I	R	R	R	R
L125	R	S	R	S	S	I	I	R	R	I	R	I	S	S
L134	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R
L164	R	I	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R
L281	R	R	S	S	S	I	S	R	R	I	R	R	R	S

R : resistant, S : sensitive, I : intermediate

AK : amikacin, AML : amoxycillin, AMP : ampicillin, C : chloramphenicol

E : erythromycin, G : gentamicin, K : kanamycin, NA : nalidixic acid

NOR : norfloxacin, P : penicillin G, PB : polymyxin B, S : streptomycin

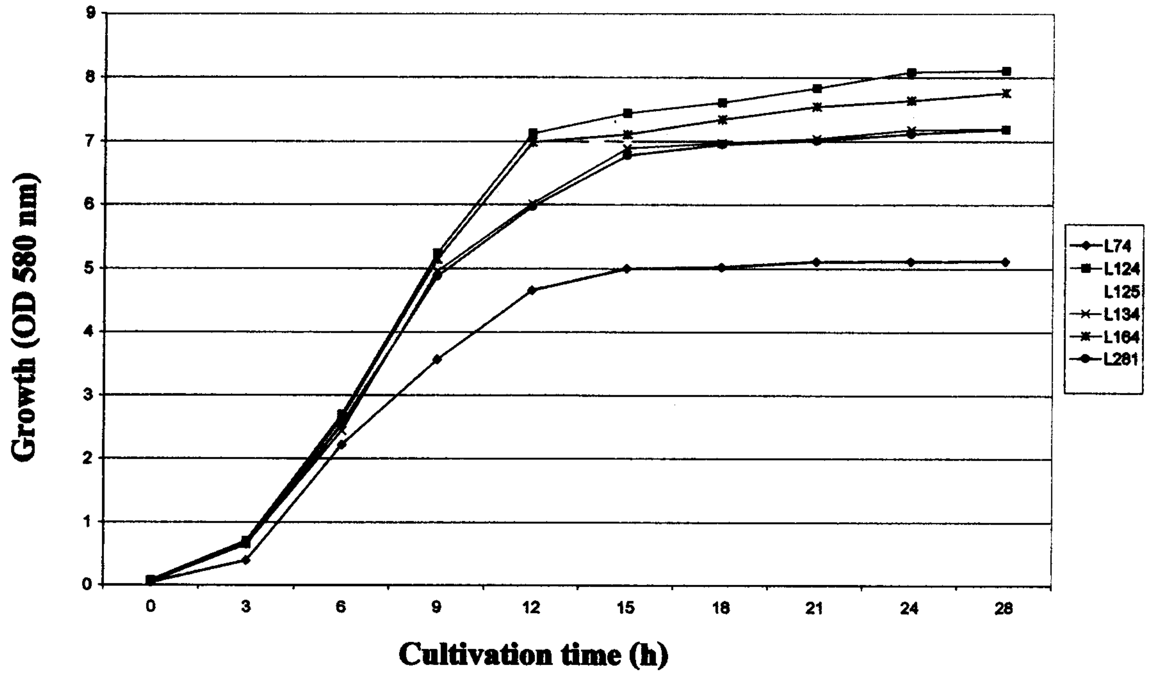
TE : tetracycline, V : vancomycin

6. การศึกษาการเจริญของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

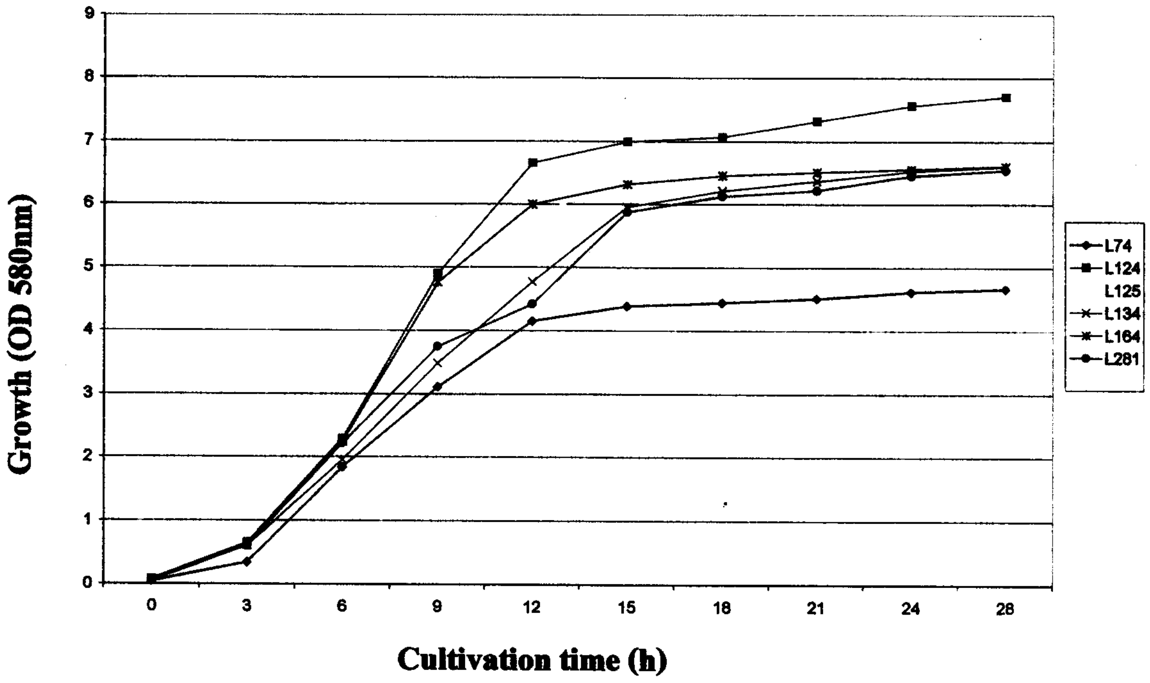
นำโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกทั้ง 6 สายพันธุ์มาศึกษาการเจริญในอาหาร MRS broth ที่ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm เปรียบเทียบกับไม่มีการเขย่า พบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกทั้ง 6 สายพันธุ์มี lag phase ใกล้เคียงกันคือประมาณ 3 ชั่วโมง เจริญเข้าสู่ระยะ log phase จนถึงชั่วโมงที่ 12 (รูปที่ 9) โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ L 124 เจริญได้ดีที่สุดโดยมีค่า generation time เท่ากับ 2.25 และ 2.00 ชั่วโมงตามลำดับ ส่วนโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก สายพันธุ์ L74 เจริญช้าที่สุด มีค่า generation time เท่ากับ 3.00 และ 2.80 ชั่วโมงตามลำดับ (ตารางที่ 11) เมื่อเปรียบเทียบการเจริญในสภาวะที่มีการเขย่าและไม่มีการเขย่า พบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกทั้ง 6 สายพันธุ์มีการเจริญในสภาวะที่ไม่มีการเขย่าดีกว่าสภาวะที่มีการเขย่า คือมีค่า generation time 2.00 – 2.80 ชั่วโมง และ 2.25 – 3.00 ชั่วโมง ตามลำดับ

ตารางที่ 11 generation time ของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

เชื้อแบคทีเรียแลกติก	Generation time (GT) (ชม.)	
	เขย่า	ไม่เขย่า
L74	3.00	2.80
L124	2.25	2.00
L125	2.50	2.30
L134	2.75	2.50
L164	2.50	2.50
L281	2.75	2.50



A : เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า



B : เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการเขย่า

รูปที่ 9 การเจริญของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 28 ชั่วโมง

7. การเทียบเคียงชนิดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

นำโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกทั้ง 6 สายพันธุ์มาทำการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 12 และ 13, รูปที่ 10 และเมื่อนำผลที่ได้ไปเทียบเคียงชนิดโดยใช้ program computer ของบริษัท Biomerieux (http://apiweb.biomerieux.com) พบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 6 สายพันธุ์เป็น *Lactobacillus plantarum* โดยมีเปอร์เซ็นต์บ่งชี้ชนิดเท่ากับ 99.9 % (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 12 สมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

ลักษณะที่ศึกษา	รหัสแบคทีเรียแลกติก					
	L74	L124	L125	L134	L164	L281
<u>การเทียบเคียงในระดับจีนัส</u> 1. รูปร่าง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง
2. การเจริญที่ 10 °C	-	-	-	-	-	-
การเจริญที่ 45 °C	-	-	-	-	-	-
3. การเจริญในร้อยละ 6.5 NaCl	+	+	+	+	+	+
การเจริญในร้อยละ 18 NaCl	-	-	-	-	-	-
4. การเจริญที่ pH 4.4	+	+	+	+	+	+
การเจริญที่ pH 9.6	-	-	-	-	-	-
5. Tetrad formation	-	-	-	-	-	-
6.การหมักคาร์โบไฮเดรต - ribose (pentose)	+	+	+	+	+	+
- glucose (hexose)	+	+	+	+	+	+
<u>การเทียบเคียงในระดับสปีชีส์</u>						
1. การเจริญที่ 30 °C	+	+	+	+	+	+
การเจริญที่ 40 °C	+	+	+	+	+	+
การเจริญที่ 50 °C	-	-	-	-	-	-
2. การเจริญในร้อยละ 4 NaCl	+	+	+	+	+	+
3. การเจริญที่ pH 4.2	+	+	+	+	+	+
การเจริญที่ pH 7.5	+	+	+	+	+	+
การเจริญที่ pH 8.5	+	+	+	+	+	+

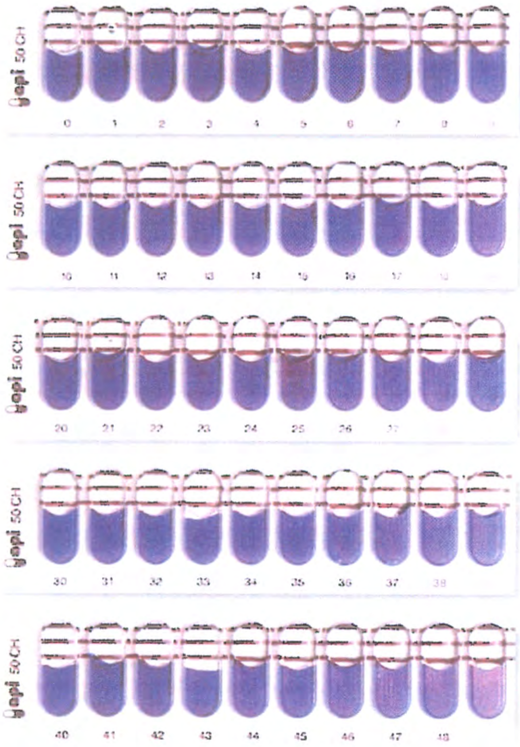
ตารางที่ 13 การหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ API 50 CH

ลำดับ	Test	Strain					
		L 74	L 124	L 125	L 134	L 164	L 281
1	Glycerol	-	-	-	-	-	-
2	Erythritol	-	-	-	-	-	-
3	D-Arabinose	-	-	-	-	-	-
4	L-Arabinose	+	+	+	+	+	+
5	Ribose	+	+	+	+	+	+
6	D-Xylose	-	-	-	-	-	-
7	L-Xylose	-	-	-	-	-	-
8	Adonitol	-	-	-	-	-	-
9	β-Methyl-D-xyloside	-	-	-	-	-	-
10	Galactose	+	+	+	+	+	+
11	D-Glucose	+	+	+	+	+	+
12	D-Fructose	+	+	+	+	+	+
13	D-Mannose	+	+	+	+	+	+
14	L-Sorbose	-	-	-	-	-	-
15	Rhamnose	-	-	-	-	-	-
16	Dulcitol	-	-	-	-	-	-
17	Inositol	-	-	-	-	-	-
18	Mannitol	+	+	+	+	+	+
19	Sorbitol	+	+	+	+	+	+
20	α- Methyl-D-manoside	+	+	+	+	+	+
21	α- Methyl-D-glucoside	-	-	-	-	-	-
22	N-Acetyl-glucosamine	+	+	+	+	+	+
23	Amygdalin	+	+	+	+	+	+
24	Arbutin	+	+	+	+	+	+
25	Esculin	+	+	+	+	+	+

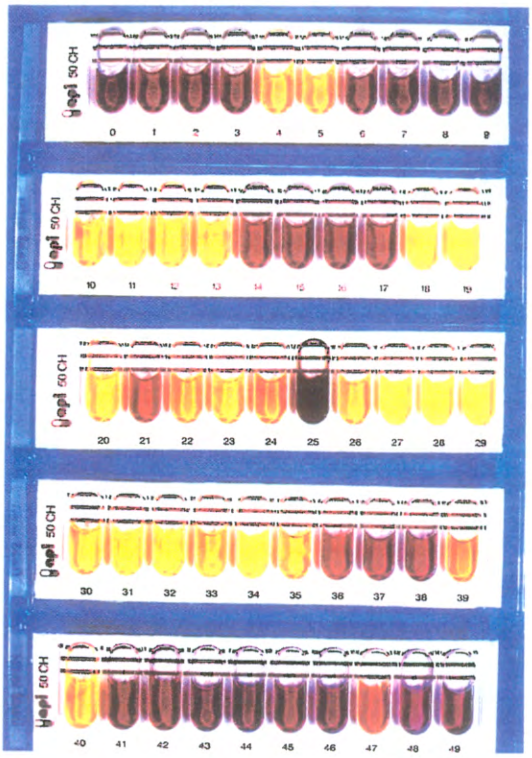
ตารางที่ 13 (ต่อ)

ลำดับ	Test	Strain					
		L 74	L 124	L 125	L 134	L 164	L 281
26	Salicin	+	+	+	+	+	+
27	Cellobiose	+	+	+	+	+	+
28	Maltose	+	+	+	+	+	+
29	Sucrose	+	+	+	+	+	+
30	Lactose	+	+	+	+	+	+
31	Melibiose	+	+	+	+	+	+
32	Trehalose	+	+	+	+	+	+
33	Inulin	-	-	-	-	-	-
34	Melezitose	+	+	+	+	+	+
35	D-Raffinose	+	+	+	+	+	+
36	Starch	d	d	d	d	d	d
37	Glycogen	d	d	d	d	d	d
38	Xylitol	-	-	-	-	-	-
39	β-Gentiobiose	d	d	d	d	d	d
40	D-Turanose	+	+	+	+	+	+
41	D-Lyxose	-	-	-	-	-	-
42	D-Tagatose	-	-	-	-	-	-
43	D-Fucose	-	-	-	-	-	-
44	L- Fucose	-	-	-	-	-	-
45	D-Arabitol	-	-	-	-	-	-
46	L-Arabitol	-	-	-	-	-	-
47	Gluconate	d	d	d	d	d	d
48	2-Keto- gluconate	-	-	-	-	-	-
49	5-Keto- gluconate	-	-	-	-	-	-

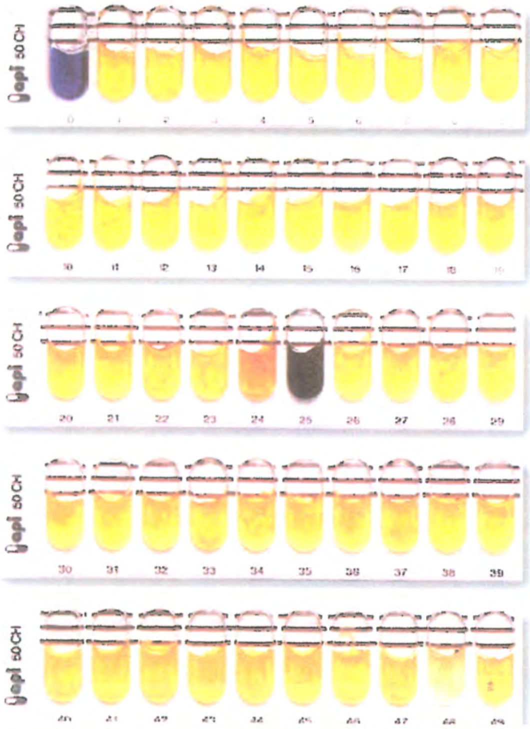
+ : acid production (positive), - : no acid production , d : delayed reaction



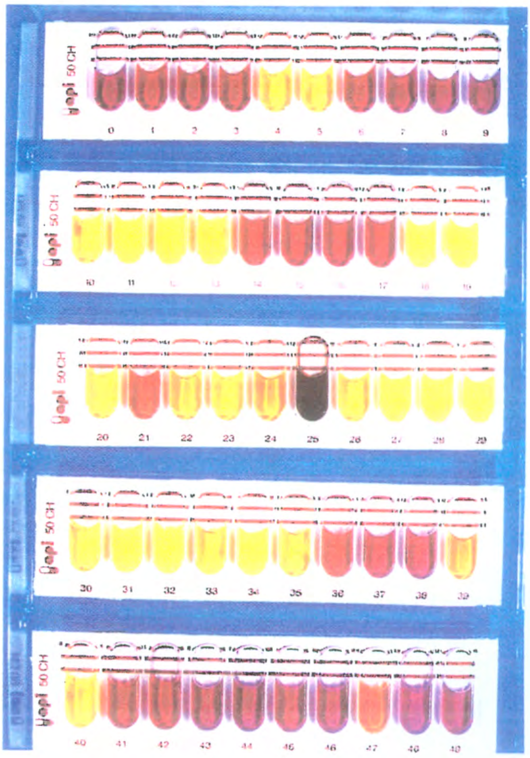
Negative control



test (L134)



positive control



test (L281)

รูปที่ 10 การบ่งชี้ชนิดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกโดย API 50 CH

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์การบ่งชี้ชนิดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้โดย program computer

รหัสเชื้อ	แหล่งที่มา	ชนิดของแบคทีเรียแลกติก	เปอร์เซ็นต์บ่งชี้
L 74	คณะเกษตรศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล จ. นครศรีธรรมราช	*Lactobacillus plantarum*	99.9
L 124	คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา	*Lactobacillus plantarum*	99.9
L 125	คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา	*Lactobacillus plantarum*	99.9
L 134	คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา	*Lactobacillus plantarum*	99.9
L 164	คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา	*Lactobacillus plantarum*	99.9
L 281	ฟาร์มสุกร จ. ตรัง	*Lactobacillus plantarum*	99.9