บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักของไทย

การเก็บตัวอย่างอาหารหมักของไทย 23 ชนิด จากตลาดสดพลาซ่าส์ ตลาดสดคลองเรียน ตลาดนัดหัวรั้ว ตลาดนัดเกาะหมี และตลาดนัดเกาะเสือใน อ. หาดใหญ่ จ.สงขลา โดยที่อาหารหมักของไทยที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียแลกติกมี 180 ตัวอย่าง พบว่า อาหารหมักของไทยที่พบแบคทีเรียแลกติกมี 88 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 48.9 และจำนวนแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้มี 328 สายพันธุ์ (ตาราง 7 และ 8)

สำหรับอาหารหมักของไทยที่นำมาศึกษาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ อาหารหมักจากสัตว์ และอาหารหมักจากพืช ดังตาราง 7 มีการใช้อาหารหมักจากสัตว์ 12 ชนิด ได้แก่ บูดู ปลาแป้งแดง จิ้งจัง ไตปลา ปลาร้า กุ้งส้ม หนาง น้ำเคย ไส้กรอกเปรี้ยว ปลาสัมฟัก แหนม และกะปี ซึ่งมีจำนวน 129 ตัวอย่าง มีตัวอย่างที่สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 65 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 50.4 ของอาหารหมักจากสัตว์ทั้งหมด จำนวนเชื้อที่แยกได้ 234 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 71.3 ของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่แยกได้ จะเห็นได้ว่าอาหารหมักของไทยจากสัตว์บางชนิดไม่พบแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ กะปี จากการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของกะปี พบว่า ส่วนใหญ่กะปีจะมีปริมาณเกลือประมาณร้อยละ 18.81-33.93 มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 4.97-17.27 มีปริมาณโปรตีนร้อยละ11.07-27.51 และมีปริมาณไขมันร้อยละ 0.28-0.95 (มณฑกานต์ ทองสม, 2544) การที่มีความเข้มข้นเกลือสูงทำให้ไม่เหมาะต่อการเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่ไม่ทนเกลือ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาหาร้อยละของเกลือในอาหารหมักของไทย ส่วนใหญ่พบว่าอยู่ในช่วง 1.5-4.1 ซึ่งสามารถแยกเชื้อ lactobacilli ได้ (ศิรินาถ หนูเอก, 2540) ส่วนอาหารหมักของไทยจากพืช 11 ชนิด ได้แก่ ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง สะตอดอง ขนมจีน หัวไชโป๊ หน่อไม้ดอง กระเทียมดอง บัวหิมะ ข้าวหมาก ซีเซ็กฉ่าย และตั้งฉ่าย สามารถแยก

เป็นอาหารหมักจากพืชได้ 51 ตัวอย่าง มีตัวอย่างที่สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 23 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 45.1 ของอาหารหมักจากพืชทั้งหมด จำนวนเชื้อที่แยกได้ 94 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 28.7 ของจำนวนสายพันธุ์ที่แยกได้ จะเห็นได้ว่าอาหารหมักจากพืชบางชนิดไม่พบแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ ซีเซ็กฉ่ายและตั้งฉ่าย ซึ่งมีความเข้มข้นของเกลือประมาณร้อยละ 19.31-25.26 ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่ไม่ทนเกลือ และพบว่าเป็นการหมักของผลิตภัณฑ์ในขั้นสุดท้ายจึงไม่สามารถตรวจพบแบคทีเรียแลกติก (ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์) ถ้าเปรียบเทียบระหว่างอาหารหมักจากสัตว์และอาหารหมักจากพืช พบว่า อาหารหมักจากสัตว์สามารถพบแบคทีเรียแลกติกได้สูงกว่าอาหารหมักจากพืช เนื่องจากอาหารหมักจากสัตว์มีคุณสมบัติงอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น มี pH และส่วนประกอบของธาตุอาหารต่างๆ ทำให้แบคทีเรียแลกติกเจริญได้ดี (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534) สำหรับจำนวนแบคทีเรียแลกติกในอาหารหมักของไทย เมื่อนับโดยวิธี plate count technique ด้วยอาหาร MRS พบว่า อาหารหมักจากสัตว์ มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ระหว่าง $9.5x10^5$-$4x10^9$ CFU/g ส่วนอาหารหมักจากพืชมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ระหว่าง $5.5x10^6$-$6.5x10^9$ CFU/g (ตาราง 7 และ 8)

2. การแยกแบคทีเรียแลกติกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกโดย streak plate technique บน MRS agar ที่มีการเติม bromocresol purple สามารถแยกให้โคโลนีเดี่ยวๆได้แตกต่างกัน เช่น โคโลนีใหญ่ ขอบเรียบ นูน ทึบ รอบโคโลนีเป็นสีเหลือง โคโลนีเล็ก ขอบเรียบ นูน ทึบ รอบโคโลนีเป็นสีเหลือง เนื่องจากการสร้างกรดแลกติกของแบคทีเรียแลกติก ทำให้มีการเปลี่ยนสีของ bromocresol purple จากสีม่วงเป็นสีเหลือง ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลสจะให้ผลลบ และเมื่อทำการย้อมสีแกรมจะติดสีแกรมบวก มีลักษณะรูปร่างและการเรียงตัวหลายแบบ (ตาราง 9 และภาพประกอบ 2) เช่น รูปร่างแท่ง อาจเป็นแท่งสั้นหรือแท่งยาว เรียงตัวเป็นโซ่ จำนวนเชื้อที่แยกได้มี 293 สายพันธุ์ รูปร่างกลม เรียงตัวแบบกระจาย จำนวนเชื้อที่แยกได้มี 27 สายพันธุ์ รูปร่างกลม เรียงตัวแบบคู่ จำนวนเชื้อ

ที่แยกได้มี 3 สายพันธุ์ และรูปร่างกลม เรียงตัวแบบสี่เซลล์ติดกัน จำนวนเชื้อที่แยกได้มี 5 สายพันธุ์

ตาราง 7 แบคทีเรียแลกติกที่แยกจากอาหารหมักจากสัตว์ของไทย (LA)ที่เก็บตัวอย่างใน อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

อาหารหมักจากสัตว์	จำนวนตัวอย่างที่ใช้แยกเชื้อ	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ	ร้อยละของตัวอย่างที่พบเชื้อ	จำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่แยกได้	ร้อยละของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่แยกได้	จำนวนแบคทีเรียแลกติก (CFU/g)
ปลาแป้งแดง	17	13	76.5	49	14.9	$9.4x10^5$
จิ้งจัง	17	13	76.5	36	10.9	$10x10^5$
บูดู	5	2	40.0	4	1.2	$8.0x10^5$
ไตปลา	28	5	17.9	6	1.8	$4.2x10^6$
ปลาร้า	22	5	22.7	21	6.4	$5.7x10^7$
กุ้งส้ม	16	10	62.5	48	14.6	$5.4x10^6$
หนาง	3	2	66.7	4	1.2	$4x10^9$
น้ำเคย	3	3	100.0	7	2.1	$3x10^6$
ไส้กรอกเปรี้ยว	3	3	100.0	7	2.1	$1.5x10^7$
ปลาส้มฟัก	3	3	100.0	2	0.6	$4.4x10^7$
แหนม	9	6	66.7	50	15.2	$9.5x10^7$
กะปิ	3	0	0	0	0	0
รวม	129	65	50.4	234	71.3	-

ตาราง 8 แบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักจากพืชของไทย (LP) ที่เก็บตัวอย่างใน อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

อาหารหมักจากพืช	จำนวนตัวอย่างที่ใช้แยกเชื้อ	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อ	ร้อยละของตัวอย่างที่พบเชื้อ	จำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่แยกได้	ร้อยละของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่แยกได้	จำนวนแบคทีเรียแลกติก (CFU/g)
ผักเสี้ยนดอง	3	3	100.0	9	2.7	$7.2x10^7$
ผักกาดดอง	14	9	64.3	30	9.1	$6.5x10^9$
ข้าวหมาก	3	2	66.7	4	1.2	$4.2x10^7$
ซีเซ็กฉ่าย	2	0	0	0	0	0
สะตอดอง	2	2	100.0	18	5.5	$5.5x10^6$
ขนมจีน	4	1	25.0	2	0.6	$5.6x10^6$
หัวไชโป้	9	1	11.1	1	0.3	$5.6x10^6$
หน่อไม้ดอง	7	3	42.9	24	7.3	$5.9x10^6$
กระเทียมดอง	5	1	100.0	3	0.9	$6.0x10^6$
บัวหิมะ	1	1	100.0	3	0.9	$5.9x10^6$
ตั้งฉ่าย	1	0	0	0	0	0
รวม	51	23	45.1	94	28.7	-
รวมทั้งหมด	180	88	48.9	328	-	-

ตาราง 9 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักของไทย

อาหารหมัก	แกรม	รูปร่าง	การเรียงตัว	ทดสอบคะตาเลส	จำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่แยกได้	ร้อยละของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่แยกได้
ปลาแป้งแดง ไตปลา ปลาร้า สะตอดอง ขนมจีน ผักเสี้ยน-ดอง ผักกาดดอง แหนม ปลา-ส้มฟัก ไส้กรอกเปรี้ยว จิ้งจัง ข้าวหมาก น้ำเคย กุ้งส้ม หนาง หน่อไม้ดอง บัวหิมะ บูดู กระเทียมดอง หัวไชโป้ นม-เปรี้ยว [1]	บวก	แท่ง	โซ่สั้นๆ	-	293	89.4
ปลาแป้งแดง ไตปลา ผักกาด-ดอง แหนม ปลาส้มฟัก บูดู จิ้งจัง ไส้กรอกเปรี้ยว กุ้งส้ม ข้าวหมาก หน่อไม้ดอง	บวก	กลม	กระจาย	-	27	8.2
ผักกาดดอง	บวก	กลม	คู่	-	3	0.9
ปลาแป้งแดง แหนมจิ้งจัง กุ้ง-ส้ม	บวก	กลม	tetrad	-	5	1.5
รวม	-	-	-	-	328	-

[1] คือ ตัวเปรียบเทียบ

3. การทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ

การทดสอบในขั้นตอนนี้ใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกจากนมเปรี้ยวที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด (LA1: *Lactobacillus casei*) เป็นตัวเปรียบเทียบ

3.1 การทนต่อเกลือน้ำดี

นำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จำนวน 328 สายพันธุ์ มาทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 เนื่องจากในร่างกายมนุษย์มีความเข้มข้นเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15-0.30 (Erkkila and Petaja, 2000) จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้จำนวน 291 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 88.7 ของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่แยกได้ และเมื่อทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.30 พบว่า แบคทีเรียแลกติกสามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้จำนวน 259 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 78.9 ของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่แยกได้ (ตาราง 10) จะเห็นได้ว่าผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Erkkila and Petaja (2000) ที่ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีโดยทดลองในสภาวะที่คล้ายกับระบบทางเดินอาหาร ภายในสภาวะลำไส้เล็กใช้ MRS broth ที่มี pH 4-7 และเกลือน้ำดีมีระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 พบว่า *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถทนต่อเกลือน้ำดีมีระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.30 ที่ pH 6 เนื่องจากการที่เชื้อสามารถสร้าง bile salt hydrolase enzyme (BSH) นอกจากนี้พบว่า สายพันธุ์ของเชื้อยังเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี พบว่า *L. johnsonii* BFE 1058 และ *L. johnsonii* BFE 1061 มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีได้มากกว่า *L. johnsonii* BFE 1059 (Toit *et al.*, 1998) *L. bulgaricus, L. fermenti, L.casei, L. acidophilus* และ *L. casei shirota* ที่แยกได้จากลำไส้ของสัตว์น้ำสามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ในระดับร้อยละ 2, 4, 10, 12 และ 15 ตามลำดับ (Shirota, 1962) และจากการทดลองของ Brennan *et al.*, (1993) พบว่า *L. acidophilus* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์มีสมบัติทนต่อเกลือน้ำดีและมีความสำคัญต่อระบบสมดุลจุลินทรีย์ภายในลำไส้ อาหารเสริมที่มีเซลล์ของ *L. acidophilus* จะช่วยปรับปรุงและรักษาสมดุลจุลินทรีย์ภายในลำไส้ และช่วยรักษาโรคที่เกิดกับลำไส้ด้วย

3.2 การทนต่อกรด

นำแบคทีเรียแลกติกจำนวน 291 สายพันธุ์ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.1 มาทดสอบการทนต่อกรดที่ระดับ pH 1, 2, 3, 4 และ 5 พบว่า สายพันธุ์ LA 177 ไม่สามารถทนต่อกรดที่ระดับ pH 1, 2, 3, 4 และ 5 ส่วนเชื้ออีก 290 สายพันธุ์สามารถทนต่อกรดได้ที่ระดับ pH 5> pH 4> pH 3> pH 2> pH 1 คิดเป็นร้อยละ 99.7 ของจำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ (ตาราง10) โดยซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Erkkila and Petaja (2000) ทดสอบการทนต่อกรดโดยทดลองในสภาวะที่คล้ายกับระบบทางเดินอาหาร ภายในสภาวะกระเพาะอาหารใช้ phosphate-buffered saline ที่มี pH 1-5 พบว่า *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถมีชีวิตรอดได้สูงสุดที่ pH 3 นอกจากนี้พบว่าสายพันธุ์ของเชื้อก็มีผลต่อการทนต่อกรดด้วย พบว่า *L. johnsonii* BFE 1058 และ *L. johnsonii* BFE 1061 มีความสามารถในการทนต่อกรดได้มากกว่า *L. johnsonii* BFE 1059 (Toit *et al.*, 1998) *L. acidophilus* ADH สามารถทนต่อกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์อื่นๆ (Conway, *et al.*, 1986) *L. gasseri* สามารถรอดชีวิตได้มากที่ pH 3, 2 และ 1.5 ตามลำดับ (Arihara *et al.*, 1998)

3.3 การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง

3.3.1 การทดสอบการย่อยโปรตีน

นำแบคทีเรียแลกติกจำนวน 290 สายพันธุ์ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.2 มาทดสอบการย่อยโปรตีน พบว่า เชื้อสามารถย่อยโปรตีนได้จำนวน 98 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 33.8 ของจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ และในการย่อยโปรตีนแบคทีเรียแลกติกก็จะย่อยสลายเคซีน (casein) ซึ่งเป็นโปรตีนในน้ำนมทำให้น้ำนมมีลักษณะขุ่นขาว การย่อยสลายเคซีนได้ ทำให้เคซีนมีการละลายได้ดีขึ้นและใสขึ้น (กรรณิกา สรรพานิช และคณะ, 2531)

3.3.2 การทดสอบการย่อยไขมัน

นำแบคทีเรียแลกติกจำนวน 290 สายพันธุ์ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.2 มาทดสอบการย่อยไขมัน พบว่า เชื้อสามารถย่อยไขมันได้จำนวน 88 สายพันธุ์ คิดเป็น

ร้อยละ 30.3 ของจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ และในการย่อยสลายไขมัน แบคทีเรียแลกติกใช้เอนไซม์ลีซิลทิเนส (lecitinase) หรือ ฟอสฟาทิเดส (phosphatidase) ในการตัดพันธะฟอตเฟตเอสเทอร์ (phosphate ester) (กรรณิกา สรรพานิช และคณะ, 2531)

3.3.3 การทดสอบการย่อยแป้ง

นำแบคทีเรียแลกติกจำนวน 290 สายพันธุ์ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.2 มาทดสอบการย่อยแป้ง พบว่า เชื้อสามารถย่อยแป้งได้จำนวน 106 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 36.6 ของจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ และในการย่อยสลายแป้งซึ่งเป็นสารคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อนพวกโพลี่แซกคาไลด์ (polysaccharide) แบคทีเรียแลกติกจะย่อยสลายแป้งได้โดยใช้เอนไซม์อะไมเลส (amylase) (กรรณิกา สรรพานิช และคณะ, 2531)

จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียแลกติกจำนวน 290 สายพันธุ์มีเชื้อที่สามารถย่อยโปรตีนหรือไขมัน หรือแป้ง ได้จำนวน 165 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 56.9 ของจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ และแบคทีเรียแลกติกจำนวน 290 สายพันธุ์มีเชื้อที่สามารถย่อยทั้งโปรตีน ไขมัน และแป้ง ได้จำนวน 37 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 12.8 ของจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ (ตาราง 10) จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง สามารถแยกได้จากอาหารหมักจากสัตว์ การที่แบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายโปรตีน ไขมัน และแป้ง จะช่วยในการทำงานของระบบย่อยอาหาร ทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมสารอาหารเหล่านี้ไปใช้ได้เร็วขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Austin *et al.*, (1995) แบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน ไขมัน และแป้ง เป็นการช่วยเร่งการเจริญของสัตว์น้ำ

3.4 การทดสอบการเจริญทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

นำแบคทีเรียแลกติกจำนวน 165 สายพันธุ์โดยพิจารณาจากความสามารถในการใช้โปรตีนหรือไขมันหรือแป้งซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.3 มาทดสอบการเจริญทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน พบว่า เชื้อจำนวน 83 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 50.3 ของจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ตาราง 10) จะเห็นได้ว่า การที่เชื้อสามารถเจริญทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ก็

เพื่อความจำเป็นในการนำไปใช้ในระบบทางเดินอาหาร เพราะในระบบทางเดินอาหารส่วนใหญ่จะพบเชื้อพวก anaerobe มีจำนวนมากกว่า aerobe ในอัตราส่วน 1,000:1 (นวลจิรา ภัทรรังรอง, 2538)

3.5 การทดสอบการเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามินบี 12

นำแบคทีเรียแลกติกจำนวน 83 สายพันธุ์ซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ 3.4 มาทดสอบการเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามินบี 12 พบว่า มีเชื้อจำนวน 67 สายพันธุ์สามารถเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามินบี 12 ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 80.7 ของจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ (ตาราง 10) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ วิลาวัณย์ อัจจิมากุล (2524) ที่พบว่า *Lactobacillus plantarum* สามารถเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามินบี 12 ซึ่งวิตามินนี้เป็นสารที่มีราคาแพง และมีความสำคัญในการเป็นโคเอนไซม์ในการสังเคราะห์ DNA ถ้าหากร่างกายขาดวิตามินบี 12 ก็จะทำให้เป็นโรคโลหิตจาง ดังนั้นในการคัดเลือกเชื้อ Lactobacillus เพื่อเสริมในอาหารต้องแน่ใจว่าเชื้อดังกล่าว จะไม่แย่งวิตามินบี 12 ในระบบทางเดินอาหารซึ่งอาจทำให้ host ขาดสารอาหารได้

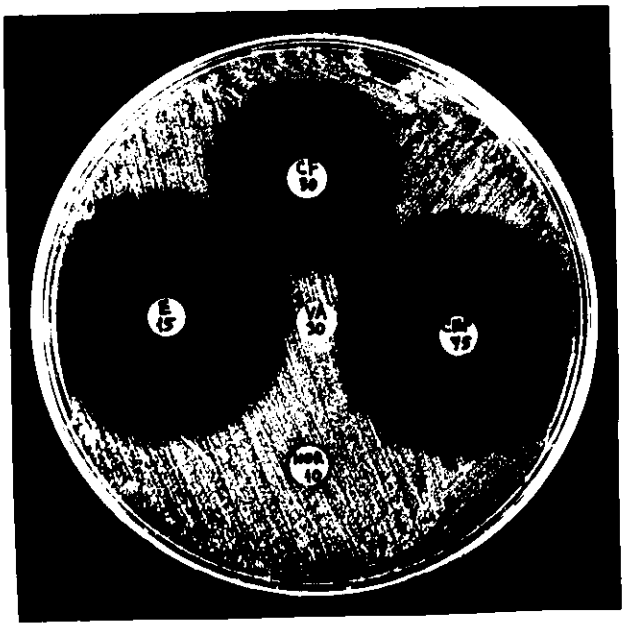
3.6 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญโดยยาปฏิชีวนะ

นำแบคทีเรียแลกติกจำนวน 67 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5 มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญโดยยาปฏิชีวนะโดย disc diffusion ตามวิธีของ Charteris *et al.*, (1998) (ภาพประกอบ 2) พบว่า เชื้อไวต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin (10 μg), cephalothin (30 μg), cefoperazone (75 μg), tetracycline (30 μg) และ chloramphenicol (30 μg) มีจำนวน 67 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 100.0 ของจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ และเชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะ vancomycin(30 μg), kanamycin (30 μg), streptomycin (10 μg), norfloxacin (10 μg) และ polymyxinB (300 μg) มีจำนวน 67 สายพันธุ์คิดเป็นร้อยละ 100.0 ของจำนวนสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ (ตาราง 11) จะเห็นได้ว่า ยาปฏิชีวนะบางชนิด เช่น tetracycline และ chloramphenicol มีการผสมลงในอาหารสัตว์ จะทำให้สัตว์เติบโตได้เร็วกว่าปกติรวมทั้งเพิ่มปริมาณการผลิตน้ำนม ในระยะเวลาต่อมามีการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นอาหารเสริม เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์มักเกิดปัญหาขึ้น

เนื่องจากการควบคุมที่ไม่ดีพอ การใช้ปริมาณมากเกินกว่าที่กำหนด การใช้นานเกินโดยไม่มีการหยุดใช้ยาก่อนฆ่า ทำให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ และเชื้อดื้อยาที่ใช้ยาบางชนิด โดยเชื้อบางชนิดอาจทำให้เกิดโรคในคนจึงทำให้เกิดปัญหาการรักษาในภายหลังดังนั้นจึงมีการใช้โปรไบโอติกเป็นสิ่งเสริมในอาหารสัตว์แทนยาปฏิชีวนะ เพราะโปรไบโอติก ไม่ก่อให้เกิดการตกค้างและการดื้อยาตามมา (สุวณีย์ สุภเวชย์, 2536) นอกจากนี้ได้มีการนำโปรไบโอติกมาใช้ในการรักษาโรคคน โดยมีการใช้ Lactobacilli ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคท้องร่วง โรคติดเชื้อกับระบบสืบพันธุ์ของเพศหญิง และโรคเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (Charteris *et al.*, 1998)

ตาราง 10 การทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากอาหารหมักของไทย

สมบัติการเป็นโปรไบโอติก	จำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ	จำนวนสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้	ร้อยละของจำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ
การทนต่อเกลือน้ำดี			
-ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.15	328	291	88.7
-ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.30	328	259	78.9
การทนต่อกรด	291	290	99.7
การย่อยโปรตีน หรือไขมัน หรือแป้ง	290	165	56.9
การย่อยทั้งโปรตีน ไขมัน และแป้ง	290	37	12.8
การเจริญในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน	165	83	50.3
การเจริญในสภาวะที่ปราศจากวิตามินบี 12	83	67	80.7



ภาพประกอบ 2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลกติกโดยยาปฏิชีวนะ (E = erythromycin/15 μg, CF = cephalothin/30 μg, VA = vancomycin/30 μg, CEP = cefoperazone/75 μg และ NOR = norfloxacin/10 μg)

ตาราง 11 จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่ถูกยับยั้งโดยยาปฏิชีวนะ

กลุ่มยาปฏิชีวนะ	ชื่อยาปฏิชีวนะ	จำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่ถูกยับยั้งโดยยาปฏิชีวนะ		
		Resistant (R)	Moderately susceptible (MS)	Susceptible (S)
กลุ่มที่ 1 ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ Penicillins	Penicillin G (P)	2	22	43
	Ampicillin (AM)	0	0	67

ตาราง 11 (ต่อ)

กลุ่มยาปฏิชีวนะ	ชื่อยาปฏิชีวนะ	จำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่ถูกยับยั้งโดยยาปฏิชีวนะ		
		Resistant (R)	Moderately susceptible (MS)	Susceptible (S)
Cephalothins	Cephalothin (CF)	0	0	67
	Ceptazidime (CAZ)	6	12	49
	Cefoperazone (CEP)	0	0	67
	Vancomycin (VA)	67	0	0
	Bacitracin (B)	45	2	20
กลุ่มที่ 2 ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน Aminoglycosides	Gentamicin (GM)	62	0	5
	Kanamycin (K)	67	0	0
	Streptomycin (S)	67	0	0
Tetracycline	Tetracycline (TE)	0	0	67
Single antibiotic	Chloramphenicol (C)	0	0	67
Macrolide	Erythromycin (E)	8	2	57
กลุ่มที่ 3 ยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก Quinolone	Norfloxacin (NOR)	67	0	0

ตาราง 11 (ต่อ)

กลุ่มยาปฏิชีวนะ	ชื่อยาปฏิชีวนะ	จำนวนสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่ถูกยับยั้งโดยยาปฏิชีวนะ		
		Resistant (R)	Moderately susceptible (MS)	Susceptible (S)
กลุ่มที่ 4 ยับยั้งหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ Polymyxin	Polymyxin B (PB)	67	0	0

3.7 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียแลกติกในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

3.7.1 ทดสอบการยับยั้งบนอาหารแข็ง (agar spot) ในสภาวะที่ไม่จำกัดกรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

นำแบคทีเรียแลกติกจำนวน 67 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ หรือแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร 13 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. cereus, S. aureus* ATCC 25923, *S. typhimurium, S. typhi, E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157:H7, *S. sonnei, S. flexneri, P.rettgeri, P.vulgaris, E. cloacae, E.aerogenes* และ *V. parahaemolyticus* (ภาพประกอบ 3) พบว่า มีแบคทีเรียแลกติกบางสายพันธุ์ ได้แก่ LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 ซึ่งแยกได้จากแหนม แหนม แหนม ปลาร้า และกุ้งส้ม ตามลำดับ (ตาราง 12) สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้ง 13 สายพันธุ์ โดยมี inhibition zone มากกว่า 10 มม. การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากแบคทีเรียแลกติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสใน MRS broth ที่มีปริมาณสูงถึงร้อยละ 2 เป็นกรดอินทรีย์ (กรดแลกติก)ได้ในปริมาณมาก และบ่มใน

สภาวะที่มีออกซิเจนก็ทำให้แบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)ได้มากขึ้นเช่นกัน ซึ่งกรดแลกติกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (มลิวรรณ ส่งเสริม, 2542) ซึ่งสอดคล้องกับการใช้แบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ต่างๆมายับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารสายพันธุ์ต่างๆโดยวิธี agar spot จะเห็นได้จากการทดลองของวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และอุบลวรรณ รอดประดิษฐ์ (2540) มีการใช้แบคทีเรียแลกติกที่แยกจากอาหารหมักของไทย คือ *Lactobacillus plantarum* 16 สายพันธุ์ *L. bavaricus* 3 สายพันธุ์ และ *L. brevis* 1 สายพันธุ์ มายับยั้ง *E. coli, B. cereus,V. parahaemolyticus, S. typhimurium,* และ *S. aureus* พบว่ามีส่วนใสการยับยั้งมากกว่า หรือเท่ากับ 10 มม.ต่อแบคทีเรียที่ทดสอบอย่างน้อย 3 ชนิด และจากการทดลองของวลัยกาญจน์ ไกรวรรณ์ (2542) แยกแบคทีเรียแลกติกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์ พบว่า K14 และ L4 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค คือ *E. coli* O157 : H7 และ *L. monocytogenes* ได้สูงสุด นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากนมและผลิตภัณฑ์นมคือ L_{30} มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค คือ *E. coli* O157 : H7, *L. monocytogenes, B. cereus* ATCC 10707, *S. aureus* ATCC 29213 และ *S. typhimurium* ได้ดีที่สุด (มลิวรรณ ส่งเสริม, 2542; สุมนา หนูเอียด, 2542)

ภาพประกอบ 3 ผลการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดย LA 71 ที่แยกจากอาหารหมักของไทยโดยวิธีการยับยั้งบนอาหารแข็ง (agar spot)

ตาราง 12 ความสามารถของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักจากสัตว์ (LA) และอาหารหมักจากสัตว์ (LP) ในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์บนอาหารแข็ง (agar spot) ในสภาวะไม่จำกัดกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

แบคทีเรียแลกติก	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์												
	S. aureus ATCC 25923	*B. cereus*	*S. sonnei*	*S. flexneri*	*P. vulgaricus*	*P. rettgeri*	*E. cloacae*	*E. aerogenes*	*E. coli* ATCC 25922	*E. coli* O157:H7	*S. typhimurium*	*S. typhi*	*V. parahaemolyticus*
LA1[1], LA6, LA13, LA71, LA102, LA198	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
LA8, LA9, LA10, LA26, LP27, LA36, LA52, LA54, LA66, LA80, LA84, LA90, LA94,	++	++	+	+	+	++	+	++	++	+	+	+	+

ตาราง 12 (ต่อ)

แบคทีเรียแลกติก	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์												
	S. aureus ATCC 25923	*B. cereus*	*S. sonnei*	*S. flexneri*	*P. vulgaricus*	*P. rettgeri*	*E. cloacae*	*E. aerogenes*	*E. coli* ATCC 25922	*E. coli* O157:H7	*S. typhimurium*	*S. typhi*	*V. parahaemolyticus*
LA122, LA136, LA171, LA178, LA187, LP225, LA230, LA236, LP239	++	++	+	+	+	++	+	++	++	+	+	+	+
LP12, LA14, LA15, LP23, LA24, LA32, LA71, LA74, LA82, LA92,	+	++	++	+	+	+	+	++	++	+	++	++	+

ตาราง 12 (ต่อ)

แบคทีเรียแลกติก	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์												
	S. aureus ATCC 25923	*B. cereus*	*S. sonnei*	*S. flexneri*	*P. vulgaricus*	*P. rettgeri*	*E. cloacae*	*E. aerogenes*	*E. coli* ATCC 25922	*E. coli* O157:H7	*S. typhimurium*	*S. typhi*	*V. parahaemolyticus*
LA158, LP188, LP232, LA242, LA243, LA245, LA246, LA247, LP250	+	++	++	+	+	+	+	++	++	+	++	++	+
LA35, LP41, LP44, LP185, LA197, LA207	++	+	++	+	+	++	+	++	++	++	+	+	+
LA53, LA58	++	+	+	++	+	+	++	++	+	+	+	+	+

ตาราง 12 (ต่อ)

แบคทีเรียแลกติก	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์												
	S. aureus ATCC 25923	*B. cereus*	*S. sonnei*	*S. flexneri*	*P. vulgaricus*	*P. rettgeri*	*E. cloacae*	*E. aerogenes*	*E. coli* ATCC 25922	*E. coli* O157:H7	*S. typhimurium*	*S. typhi*	*V. parahaemolyticus*
LA99, LA130, LP215	+	++	++	+	++	++	+	+	+	++	+	+	+
LA156, LP180, LP241, LA252	++	+	++	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+
LA159, LA160	+	++	++	+	++	+	++	++	+	++	+	+	+
LA37, LP181, LA235	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+
LP213	-	+	-	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+

[1] คือ เชื้อที่แยกจากนมเปรี้ยวที่จำหน่ายตามท้องตลาดใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

+ คือ ขนาดของขอบวงใสน้อยกว่า 10 มม.

++ คือ ขนาดของขอบวงใสมากกว่า 10 มม.

- คือ ไม่มีขอบวงใส (0 มม.)

3.7.2 การทดสอบการยับยั้งบนอาหารแข็ง (agar spot) ในสภาวะที่ไม่จำกัดกรดอินทรีย์ แต่จำกัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

นำแบคทีเรียแลกติก 5 สายพันธุ์จากข้อ 3.7.1 ได้แก่ LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 13 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ LA71 มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 13 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด สำหรับขอบวงใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์บางตัว จะมีขนาดเล็กกว่าการยับยั้งที่ทดสอบในสภาพที่ไม่จำกัดกรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดัง(ตาราง13) การยับยั้งที่เกิดขึ้นนี้เนื่องจากการที่แบคทีเรียแลกติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสใน MRS broth ซึ่งมีปริมาณสูงถึงร้อยละ 2 เป็นกรดแลกติกในปริมาณมากพอ ถึงแม้ว่าทำการบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะไปจำกัดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่แบคทีเรียแลกติกก็ยังคงยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (มลิวรรณ ส่งเสริม, 2542)

3.7.3 การทดสอบการยับยั้งบนอาหารแข็ง (agar spot) ในสภาวะที่จำกัดกรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

นำแบคทีเรียแลกติก 5 สายพันธุ์จากข้อ 3.7.2 ได้แก่ LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 พบว่า มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 13 สายพันธุ์ พบว่า สายพันธุ์ LA71 สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ 12 สายพันธุ์ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *V. parahaemolyticus* สำหรับขอบวงใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์บางตัวมีขนาดเล็กกว่าการยับยั้งที่ทดสอบในสภาพที่ไม่จำกัดกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดัง (ตาราง 14) เนื่องจากการที่น้ำตาลกลูโคสใน MRS broth มีเพียงร้อยละ 0.2 ทำให้แบคทีเรียแลกติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลกติกได้น้อย และการบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะทำให้เกิดการจำกัดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ดังนั้นการยับยั้งที่เกิดขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากการที่แบคทีเรียแลกติกสร้าง bacteriocin หรือสร้างสารยับยั้งตัวอื่นๆ เช่น lactacin และ acidolin เป็นต้น (มลิวรรณ ส่งเสริม, 2542) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองใช้แบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ต่างๆ มายับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี agar spot ทดลองใช้ MRS broth ที่มี

ตาราง 13 ความสามารถของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากอาหารหมักจากสัตว์ (LA) และอาหารหมักจากพืช (LP) ในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์บนอาหารแข็ง (agar spot) ในสภาวะที่ไม่จำกัดการสร้างกรดอินทรีย์ แต่จำกัดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

แบคทีเรียแลกติก	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์												
	S. aureus ATCC 25923	*B. cereus*	*S. sonnei*	*S. flexneri*	*P. vulgaricus*	*P. retigeri*	*E. cloacae*	*E. aerogenes*	*E. coli* ATCC 25922	*E. coli* O157:H7	*S. typhimurium*	*S. typhi*	*V. parahaemolyticus*
LA1[1]	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++
LA6, LA13	++	++	+	+	++	++	++	+	++	+	++	++	+
LA71	++	++	+	++	++	++	+	+	++	+	++	++	++
LA102, LA198	++	++	+	+	++	++	+	+	++	+	++	++	++
LA8, LA9, LP23, LA24, LA32, LA35, LA36, LA52, LA54, LA66, LA84,	++	-	+	+	+	++	+	+	-	+	++	-	-

ตาราง 13 (ต่อ)

แบคทีเรียแลกติก	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์												
	S. aureus ATCC 25923	*B. cereus*	*S. sonnei*	*S. flexneri*	*P. vulgaricus*	*P. rettgeri*	*E. cloacae*	*E. aerogenes*	*E. coli* ATCC 25922	*E. coli* O157:H7	*S. typhimurium*	*S. typhi*	*V. parahaemolyticus*
LA90, LA159, LA171, LP180, LP181	++	-	+	+	+	++	+	+	-	+	++	-	-
LA10, LP12, LP41, LP44, LA74, LA80, LA92, LA94, LA130, LA173, LP185, LA197, LA207, LP215,	+	-	-	+	+	++	+	++	+	+	+	+	-

ตาราง 13 (ต่อ)

แบคทีเรียแลกติก	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์												
	S. aureus ATCC 25923	*B. cereus*	*S. sonnei*	*S. flexneri*	*P. vulgaricus*	*P. rettgeri*	*E. cloacae*	*E. aerogenes*	*E. coli* ATCC 25922	*E. coli* O157:H7	*S. typhimurium*	*S. typhi*	*V. parahaemolyticus*
LP225, LA236, LP239, LP241, LA242, LA243, LP250, LA252	+	-	-	+	+	++	+	++	+	+	+	+	-
LA14, LA15, LP27, LA82, LA122, LA136	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LA26, LA29, LA53, LA58, LA99, LA156,	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตาราง 13 (ต่อ)

แบคทีเรียแลกติก	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์												
	S. aureus ATCC 25923	*B. cereus*	*S. sonnei*	*S. flexneri*	*P. vulgaricus*	*P. rettgeri*	*E. cloacae*	*E. aerogenes*	*E. coli* ATCC 25922	*E. coli* O157:H7	*S. typhimurium*	*S. typhi*	*V. parahaemolyticus*
LA158, LA160, LA178, LA187, LP188, LA202, LA230, LP232, LA235, LA245, LA246, LA247	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[1] คือ เชื้อที่แยกจากนมเปรี้ยวที่จำหน่ายตามท้องตลาดใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

++ คือ ขนาดของขอบวงใสมากกว่า 10 มม.

+ คือ ขนาดของขอบวงใสน้อยกว่า 10 มม.

- คือ ไม่มีขอบวงใส (0 มม.)

น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 0.2 และบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เห็นได้จากการทดลองของ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และอังคณา สุขบุญ (2541) แยกแบคทีเรียแลกติกจากไส้กรอกเปรี้ยว พบว่า มีเพียง *Lactobacillus* 3 สายพันธุ์ และ *Pediococcus* 1 สายพันธุ์เท่านั้นที่แสดงผลการยับยั้ง *S. typhimurium* เพียงเล็กน้อย และจากการแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักพื้นบ้าน 212 isolates มีเพียง 10 isolates คือ *L. plantarum* 6 isolates *L. brevis* และ *L. fermentum* อย่างละ 2 isolates ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค คือ *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922และ *S. typhimurium* 3230 (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2543) นอกจากนี้อรัญญา สังขศรี (2541) ทำการคัดแยก *Lactobacillus* spp. จากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย เมื่อนำเชื้อทั้ง 16 สายพันธุ์มาเทียบเคียงชนิดพบว่าเป็น *L. plantarum* 6 สายพันธุ์ *Lactobacillus* spp. 4 สายพันธุ์ *L. brevis* 1 สายพันธุ์ *L. fermenti* 1 สายพันธุ์ *L. amylovorus* 1 สายพันธุ์ *L. bavaricus* 1 สายพันธุ์ *L. casei* subsp. *casei* 1 สายพันธุ์ และ *L. johnsonii* 1 สายพันธุ์ นำเชื้อดังกล่าวข้างต้นมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *B. cereus, E. coli* 1188, *E. coli* ATCC 25922, , *S. typhi* 3299, *E. coli* R43, *S. anatum* E1, *S. enteritidis* 3259, *S. enteritidis* 3294, *S. typhimurium* 3292 และ *S. aureus* ATCC 25923 พบว่า *Lactobacillus* spp. A30b, *L. plantarum* (A49a, A56c, A61a) และ *L. bavaricus* A53b สามารถสร้างสารยับยั้งนอกเหนือจากกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากการทดลองต่างๆจะเห็นได้ว่า แบคทีเรียแลกติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกและแกรมลบได้ดีพอๆกัน ต่างจากการทดลองของอรตรี รอดเจริญ (2542) ศึกษาการแยกเชื้อ *Pediococcus* spp. จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย เมื่อนำไปเทียบเคียงชนิดพบว่าเป็น *P. acidilactici* 28 สายพันธุ์ *P. pentosaceus* 14 สายพันธุ์ และ *P. urinaeequi* 1 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค คือ *B. cereus* ATCC 11778, *S. aureus* ATCC 29273 ได้ดีกว่า *E. coli* O157 : H7 และ *S. typhimurium* 3230 แต่เมื่อทดลองในสภาวะที่จำกัดกรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่า *Pediococcus* spp. สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้น้อยมาก และไม่พบการยับยั้ง *E. coli* O157 : H7

ตาราง 14 ความสามารถของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักจากสัตว์ (LA) และอาหารหมักจากพืช (LP) ในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์บนอาหารแข็ง (agar spot) ในสภาวะที่จำกัดการสร้างกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

แบคทีเรียแลกติก	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์												
	S. aureus ATCC 25923	*B. cereus*	*S. sonnei*	*S. flexneri*	*P. vulgaricus*	*P. retgeri*	*E. cloacae*	*E. aerogenes*	*E. coli* ATCC 25922	*E. coli* O157:H7	*S. typhimurium*	*S. typhi*	*V. parahaemolyticus*
LA1[1]	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
LA6	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
LA13	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
LA71	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
LA102	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
LA198	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
LA8, LP27, LA36, LP41, LA54, LA74, LA80,	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-

ตาราง 14 (ต่อ)

แบคทีเรียแลกติก	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์												
	S. aureus ATCC 25923	*B. cereus*	*S. sonnei*	*S. flexneri*	*P. vulgaricus*	*P. rettgeri*	*E. cloacae*	*E. aerogenes*	*E. coli* ATCC 25922	*E. coli* O157:H7	*S. typhimurium*	*S. typhi*	*V. parahaemolyticus*
LA90, LA156, LA158, LA159, LP181	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
LP9, LA10 LA32, LA35, LA171, LP185, LP188, LA207, LP232, LP250	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
LP12, LA14, LA15, LP23,	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตาราง 14 (ต่อ)

แบคทีเรียแลกติก	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์												
	S. aureus ATCC 25923	*B. cereus*	*S. sonnei*	*S. flexneri*	*P. vulgaricus*	*P. rettgeri*	*E. cloacae*	*E. aerogenes*	*E. coli* ATCC 25922	*E. coli* O157:H7	*S. typhimurium*	*S. typhi*	*V. parahaemolyticus*
LA24, LA26, LA29, LP44, LA52, LA53, LA58, LA66, LA82, LA84, LA92, LA94, LA99, LA122, LA130, LA136, LA173, LA178, LP180, LA187,	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตาราง 14 (ต่อ)

แบคทีเรียแลกติก	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์												
	S. aureus ATCC 25923	*B. cereus*	*S. sonnei*	*S. flexneri*	*P. vulgaricus*	*P. rettgeri*	*E. cloacae*	*E. aerogenes*	*E. coli* ATCC 25922	*E. coli* O157:H7	*S. typhimurium*	*S. typhi*	*V. parahaemolyticus*
LA197, LA202, LP213, LP215, LP225, LA230, LA235, LA236, LP239, LP241, LA242, LA243, LA245, LA246, LA247, LA252	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[1] คือ เชื้อที่แยกจากยาคูลท์ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

++ คือ ขนาดขอบวงใสมากกว่า 10 มม.,

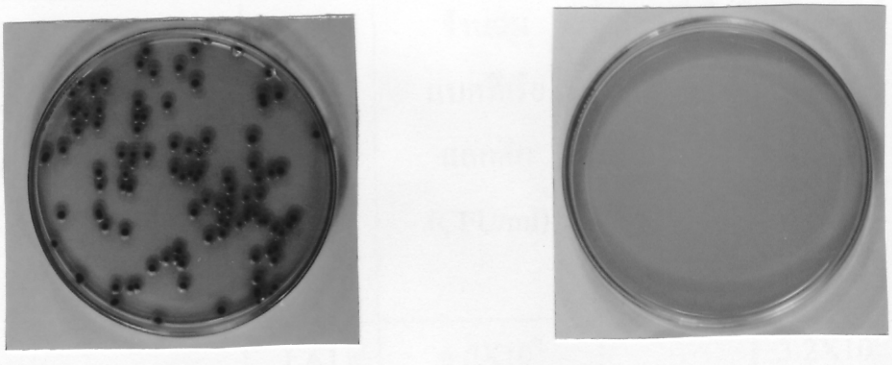
\+ คือ ขนาดขอบวงใสน้อยกว่า 10 มม.

\- คือ ไม่มีขอบวงใส (0 มม.)

3.7.4 การทดสอบการยับยั้งโดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน

นำเชื้อแบคทีเรียแลกติก ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่แยกได้จากข้อ 3.6 ได้แก่ LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 และแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 13 สายพันธุ์ คือ *B. cereus, S. aureus* ATCC 25923, *S. typhimurium, S. typhi, E. coli* ATCC 25922, *E. coli* O157 : H7, *S. sonnei, S. flexneri, P.rettgeri, P.vulgaris, E. cloacae, E. aerogenes* และ *V. parahaemolyticus* มาเพาะเลี้ยงร่วมกันแล้วตรวจนับจำนวนแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่เหลือโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ลงไป แล้วนำมาหาร้อยละการยับยั้ง พบว่า แบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถสร้างสารยับยั้ง *B. cereus, S. flexneri, P.rettgeri, P.vulgaris, E.aerogenes* และ *V. parahaemolyticus* ได้อย่างสมบูรณ์ คือ ร้อยละ 100 (ภาพประกอบ 4) ส่วนสายพันธุ์ LA13 และ LA71 สามารถสร้างสารยับยั้ง *S. aureus* ATCC25923 ได้ร้อยละ 100 สายพันธุ์ LA13, LA71 และ LA198 สามารถสร้างสารยับยั้ง *S. sonnei* ได้ร้อยละ 100 และสายพันธุ์ L198 สามารถสร้างสารยับยั้ง *E.coli* O157 : H7 ได้ร้อยละ 100 สำหรับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์สายพันธุ์อื่นๆถูกยับยั้ง โดยแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ได้แตกต่างกัน (ภาพประกอบ5)โดยมีร้อยละการยับยั้งอยู่ระหว่าง 80-99.6 (ตาราง 15) (ภาพประกอบ 6) แบคทีเรียแลกติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้งแกรมบวกและลบได้ดีพอๆกัน ซึ่งต่างจากการทดสอบการยับยั้งโดยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกันของวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และคณะ (2539) ที่ทำการศึกษา Lactobacillus จากนมเปรี้ยว 5 ยี่ห้อได้ 5 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus casei* 2 สายพันธุ์ *L. acidophilus* 2 สายพันธุ์ และ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 1 สายพันธุ์ ทดสอบการยับยั้ง พบว่า Lactobacillus ทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีกว่า *S. typhimurium* และ *E. coli* โดยมีร้อยละการยับยั้งระหว่าง 61.1-75.3 และจากการทดลองของอรัญญา สังขศรี (2541) ทำการแยก *Lactobacillus* spp. จากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย พบว่า *L. plantarum* A49a สามารถยับยั้ง *B. cereus, S. enteritidis* และ *S. typhi* 3299 ได้ดีคิดเป็นร้อยละ 100 ส่วน *S. aureus* ATCC 29213 และ *E. coli* 1189 ถูกยับยั้งได้ร้อยละ 98.78 และ 97.13 ตามลำดับ ในขณะที่ *E. coli* O157 : H7

ถูกยับยั้งได้ต่ำสุดร้อยละ 88.57 นอกจากนี้มีการแยกแบคทีเรียแลกติกจากนมและผลิตภัณฑ์นม มาทดสอบการยับยั้งพบว่า L_{30} สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* ได้ดีกว่า *E. coli* O157 : H7 โดย *L. monocytogenes* มีร้อยละการยับยั้ง 54.2 ในขณะที่ *E. coli* O157 : H7 มีร้อยละการยับยั้งร้อยละ 41.1 (มลิวรรณ ส่งเสริม, 2542) และจากการแยกแบคทีเรียแลกติกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์ พบว่า สายพันธุ์ K14 และ L4 สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* ได้ดีกว่า *E. coli* O157 : H7 (วลัยกาญจน์ ไกรวรรณ์, 2542) นอกจาก *Lactobacillus* spp. แล้ว *Pediococcus* spp. ยังมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดีเช่นกัน จากการทดลองของอรตรี รอดเจริญ (2542) ทำการแยกเชื้อ *Pediococcus* spp. จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย พบว่า P23, P24 และ P36 สามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 29273 ได้ร้อยละ 96.75-98.47 P33, P34 และ P38 สามารถยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11778 ได้ร้อยละ 94.30-96.89 P34, P39 และ P40 สามารถยับยั้ง *S. typhimurium* 3230 ได้ร้อยละ 81.88-85.84 และ P40, P41 และ P42 สามารถยับยั้ง *E. coli* O157 : H7 ได้ร้อยละ 82.05-84.55

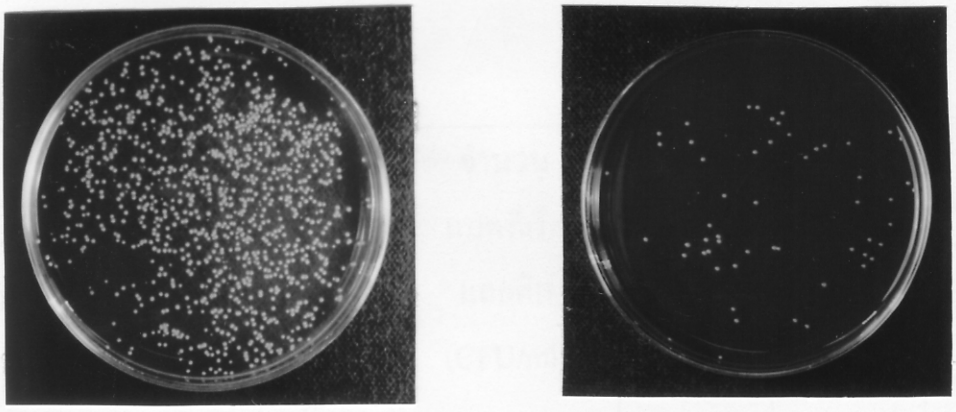


Control Test

ภาพประกอบ 4 การนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *Shigella flexneri* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Salmonella-Shigella (SS) หลังจากเพาะเลี้ยงร่วมกับ LA71

Control *S. flexneri* ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับ LA71

Test *S. flexneri* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ LA71



Control Test

ภาพประกอบ 5 การนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Manitol salt agar (MSA) หลังจากเพาะเลี้ยงร่วมกับ LA198

Control *S. aureus* ATCC 25923 ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับ LA198

Test *S. aureus* ATCC 25923 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ LA198

ตาราง 15 ความสามารถของเชื้อแบคทีเรียแลกติกในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน

แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	รหัสแบคทีเรียแลกติก	จำนวนแบคทีเรียแลกติก (CFU/ml)	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (CFU/ml)		ร้อยละการยับยั้ง
			ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
S.aureus ATCC 25923	LA1	$6.0X10^6$	$2.5X10^4$	$3.2X10^3$	87.2
	LA6	$3.2X10^7$		$1.0X10^2$	99.6
	LA13	$1.04X10^8$		0	100.0
	LA71	$8.9X10^7$		0	100.0
	LA102	$6.3X10^7$		$4.0X10^3$	84.0
	LA198	$4.2X10^7$		$5.0X10^3$	80.0

ตาราง 15 (ต่อ)

แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	รหัสแบคทีเรียแลกติก	จำนวนแบคทีเรียแลกติก (CFU/ml)	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (CFU/ml)		ร้อยละการยับยั้ง
			ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
S. sonnei	LA1	$6.0X10^{6}$	$1.4X10^{4}$	$1.0X10^{2}$	99.3
	LA6	$3.2X10^{7}$		$1.0X10^{2}$	99.3
	LA13	$1.04X10^{8}$		0	100.0
	LA71	$8.9X10^{7}$		0	100.0
	LA102	$6.3X10^{7}$		$1.2X10^{3}$	91.4
	LA198	$4.2X10^{7}$		0	100.0
S. flexneri	LA1	$6.0x10^{6}$	$1.0X10^{4}$	0	100.0
	LA6	$3.2x10^{7}$		0	100.0
	LA13	$1.04x10^{8}$		0	100.0
	LA71	$8.9X10^{7}$		0	100.0
	LA102	$6.3X10^{7}$		0	100.0
	LA198	$6.0X10^{6}$		0	100.0
P. vulgaris	LA1	$6.0X10^{6}$	$1.0X10^{4}$	0	100.0
	LA6	$3.2X10^{7}$		0	100.0
	LA13	$1.04x10^{8}$		0	100.0
	LA71	$8.9X10^{7}$		0	100.0
	LA102	$6.3X10^{7}$		0	100.0
	LA198	$4.2X10^{7}$		0	100.0

ตาราง 15 (ต่อ)

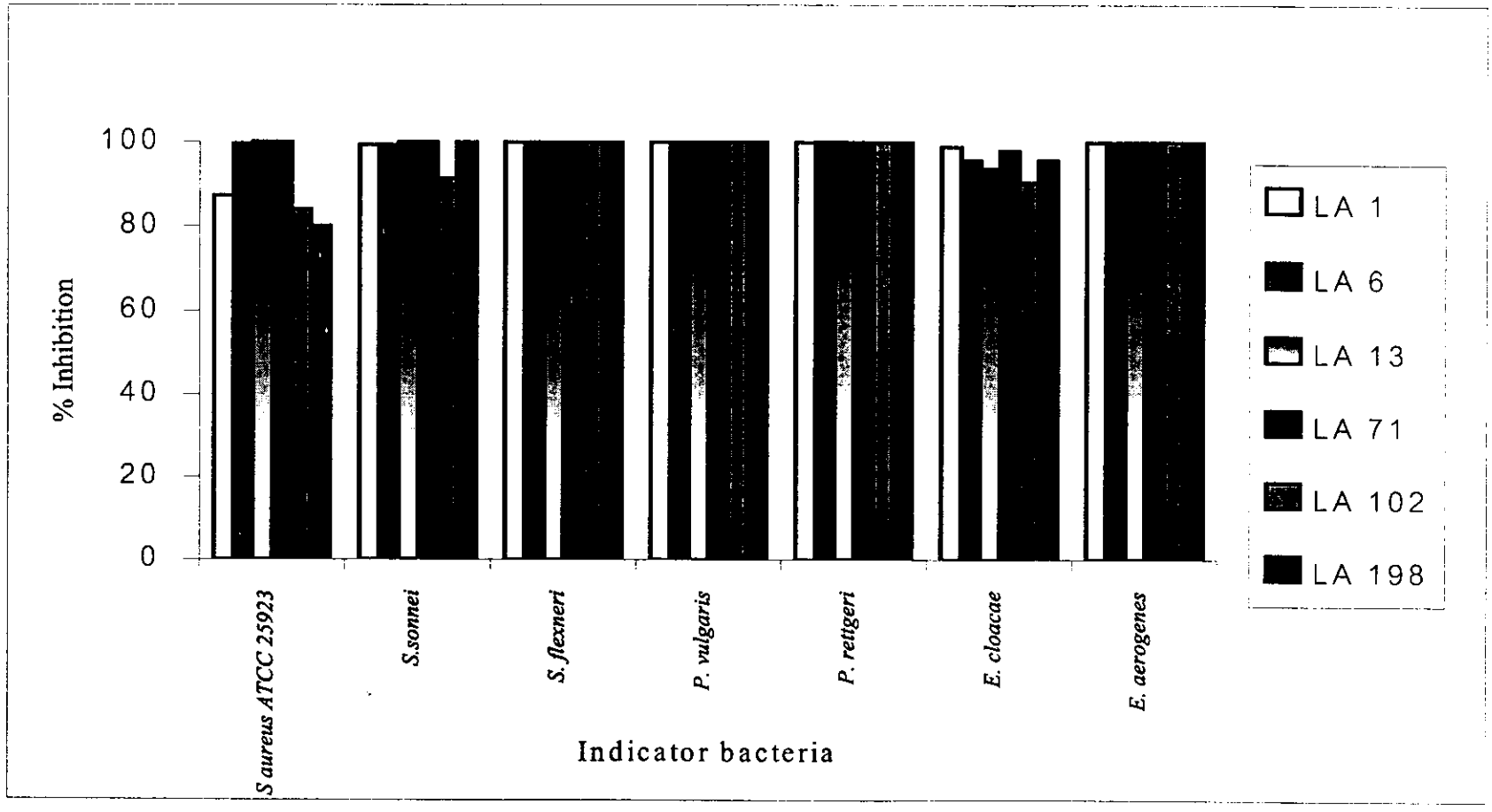
แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	รหัสแบคทีเรียแลกติก	จำนวนแบคทีเรียแลกติก (CFU/ml)	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (CFU/ml)		ร้อยละการยับยั้ง
			ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
P. rettgeri	LA1	$6.0X10^{6}$	$1.2X10^{4}$	0	100.0
	LA6	$3.2X10^{7}$		0	100.0
	LA13	$1.04x10^{8}$		0	100.0
	LA71	$8.9X10^{7}$		0	100.0
	LA102	$6.3X10^{7}$		0	100.0
	LA198	$4.2X10^{7}$		0	100.0
E. cloacae	LA1	$6.0X10^{6}$	$4.0X10^{4}$	$4.0X10^{2}$	99.0
	LA6	$3.2X10^{7}$		$1.7X10^{3}$	95.8
	LA13	$1.04x10^{8}$		$2.5X10^{3}$	93.8
	LA71	$8.9X10^{7}$		$8.0X10^{2}$	98.0
	LA102	$6.3X10^{7}$		$3.8X10^{3}$	90.5
	LA198	$4.2X10^{7}$		$1.7X10^{3}$	95.8
E. aerogenes	LA1	$6.0X10^{6}$	$1.5X10^{4}$	0	100.0
	LA6	$3.2X10^{7}$		0	100.0
	LA13	$1.04x10^{8}$		0	100.0
	LA71	$8.9X10^{7}$		0	100.0
	LA102	$6.3X10^{7}$		0	100.0
	LA198	$4.2X10^{7}$		0	100.0

ตาราง 15 (ต่อ)

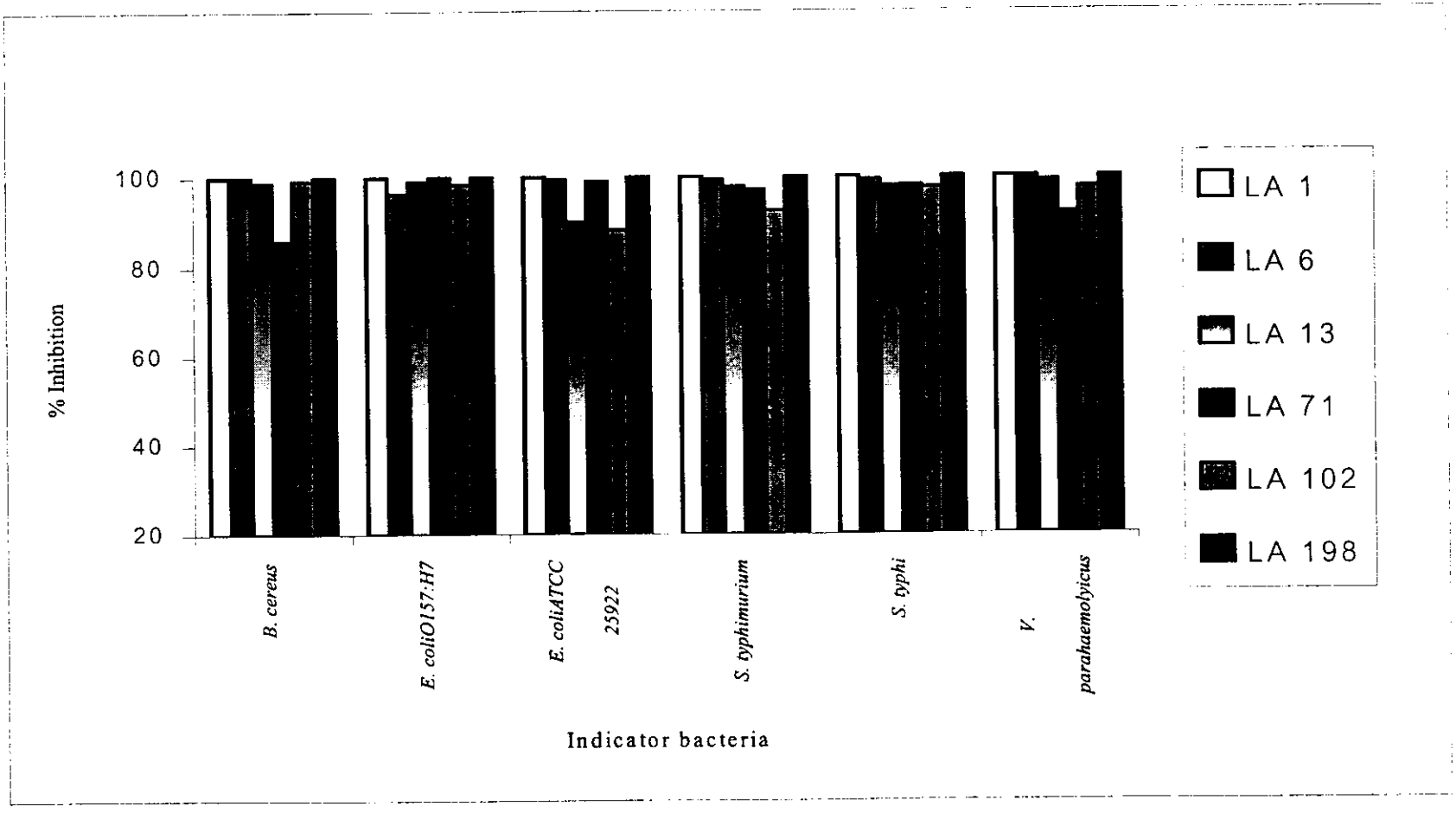
แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	รหัสแบคทีเรียแลกติก	จำนวนแบคทีเรียแลกติก (CFU/ml)	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (CFU/ml)		ร้อยละการยับยั้ง
			ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
B. cereus	LA1	$6.0X10^{6}$	$2.2X10^{4}$	0	100.0
	LA6	$3.2X10^{7}$		0	100.0
	LA13	$1.04X10^{8}$		0	100.0
	LA71	$8.9X10^{7}$		0	100.0
	LA102	$6.3X10^{7}$		0	100.0
	LA198	$4.2X10^{7}$		0	100.0
E. coli O157 : H7	LA1	$6.0X10^{6}$	$4.0X10^{4}$	0	100.0
	LA6	$3.2X10^{7}$		$1.5X10^{3}$	96.3
	LA13	$1.04X10^{8}$		$2.0X10^{2}$	99.5
	LA71	$8.9X10^{7}$		$3.0X10^{2}$	99.3
	LA102	$6.3X10^{7}$		$3.0X10^{2}$	99.3
	LA198	$4.2X10^{7}$		0	100.0
E. coli ATCC 25922	LA1	$6.0X10^{6}$	$1.0X10^{4}$	$1.1X10^{2}$	98.9
	LA6	$3.2X10^{7}$		$1.0X10^{2}$	99.0
	LA13	$1.04x10^{8}$		$1.0X10^{3}$	90.0
	LA71	$8.9X10^{7}$		$2.3X10^{2}$	97.7
	LA102	$6.3X10^{7}$		$2.2X10^{2}$	97.8
	LA198	$4.2X10^{7}$		$1.0X10^{2}$	99.0

ตาราง 15 (ต่อ)

แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	รหัสแบคทีเรียแลกติก	จำนวนแบคทีเรียแลกติก (CFU/ml)	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (CFU/ml)		ร้อยละการยับยั้ง
			ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	
S. typhimurium	LA1	$6.0X10^{6}$	$1.0X10^{4}$	$1.4X10^{3}$	86.0
	LA6	$3.2X10^{7}$		0	100.0
	LA13	$1.04x10^{8}$		$1.0X10^{2}$	99.0
	LA71	$8.9X10^{7}$		$3.0X10^{2}$	97.0
	LA102	$6.3X10^{7}$		$2.0X10^{2}$	98.0
	LA198	$4.2X10^{7}$		$8.0X10^{2}$	92.0
S. typhi	LA1	$6.0X10^{6}$	$1.2X10^{4}$	$1.0X10^{2}$	99.2
	LA6	$3.2X10^{7}$		$2.0X10^{2}$	98.3
	LA13	$1.04x10^{8}$		$1.4X10^{3}$	88.3
	LA71	$8.9X10^{7}$		$9.0X10^{2}$	92.5
	LA102	$6.3X10^{7}$		$3.0X10^{2}$	97.5
	LA198	$4.2X10^{7}$		$3.0X10^{2}$	97.5
V. parahaemolyticus	LA1	$6.0X10^{6}$	$1.1X10^{4}$	0	100.0
	LA6	$3.2X10^{7}$		0	100.0
	LA13	$1.04x10^{8}$		0	100.0
	LA71	$8.9X10^{7}$		0	100.0
	LA102	$6.3X10^{7}$		0	100.0
	LA198	$4.2X10^{7}$		0	100.0



ภาพประกอบ 6 ร้อยละการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากอาหารหมักของไทย



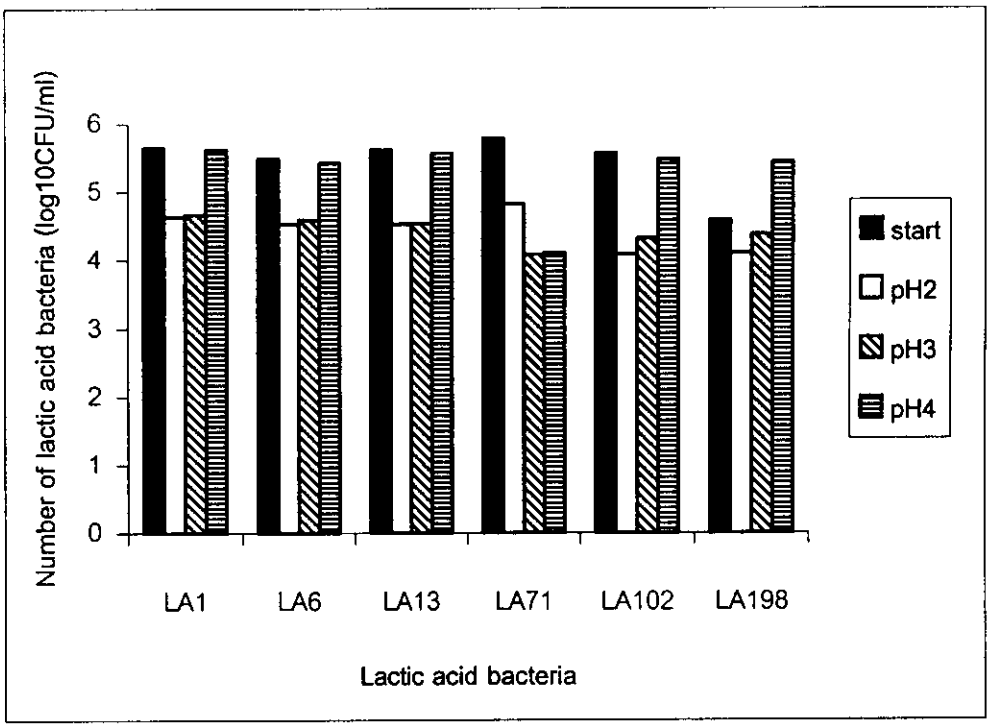
ภาพประกอบ 6 (ต่อ)

3.8 การทดสอบการอยู่รอดของแบคทีเรียแลกติกในระดับ pH 2, 3 และ 4

นำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.7 มาศึกษาการอยู่รอดที่ระดับ pH 2, 3 และ 4 เป็นเวลา 3 ชม. พบว่า สายพันธุ์ LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 สามารถอยู่รอดที่ระดับ pH 4 > pH 3 > pH2 โดยที่สายพันธุ์ LA71 สามารถมีชีวิตรอดได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ (ภาพประกอบ 7) จะเห็นได้ว่า ภายในกระเพาะอาหารมีค่า pH เป็น 2 ซึ่งมีค่าต่ำมากสามารถทำลายแบคทีเรียแลกติกได้ แต่เมื่อรับประทานอาหารเข้าไป pH ก็จะเพิ่มเป็น 3-4 การรับประทานอาหารเข้าไปอาหารจะช่วยป้องกันแบคทีเรียแลกติกจากกรด และเอนไซม์ต่างๆในระบบทางเดินอาหาร ทำให้แบคทีเรียแลกติกมีชีวิตรอดได้ภายหลังจากการย่อยของอาหาร 2-4 ชม. กระเพาะอาหารก็จะว่าง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Erkkila and Petaja (2000) ทดสอบการทนต่อกรดโดยทดลองในสภาวะที่คล้ายกับระบบทางเดินอาหาร ภายในสภาวะกระเพาะอาหารใช้ phosphate-buffered saline ที่มี pH 1-5 พบว่า *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถมีชีวิตรอดได้สูงสุดที่ pH3 นอกจากนี้พบว่าสายพันธุ์ของเชื้อก็มีผลต่อการทนต่อกรดด้วย คือ *L. johnsonii* BFE 1058 และ *L. johnsonii* BFE 1061 มีความสามารถในการทนต่อกรดได้มากกว่า *L. johnsonii* BFE 1059 (Toit *et al.*, 1998) *L. acidophilus* ADH สามารถทนต่อกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์อื่นๆ (Conway, *et al.*, 1986) *L. gasseri* สามารถรอดชีวิตได้มากที่ pH 3, 2 และ 1.5 ตามลำดับ (Arihara *et al.*, 1998)

3.9 การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียแลกติกในอาหารที่ปราศจากเนื้อสัตว์

นำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.8 มาศึกษาการเจริญในอาหารที่ปราศจากเนื้อสัตว์ (SPY2) ที่มีส่วนประกอบ คือ 25g/l soy peptone, 25 g/l yeast extract และ 25 g/l glucose monohydrate โดยเปรียบเทียบการเจริญกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS จากการศึกษาการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืน



ภาพประกอบ 7 การอยู่รอดของแบคทีเรียแลกติกในระดับ pH 2 3 และ 4 เป็นเวลา 3 ชม.

แสง (O.D.660 nm) ที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของสายพันธุ์ LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 ที่ระยะเวลา 6, 12, 24 และ 36 ชม. ใน MRS broth มากกว่าใน SPY2 แต่ค่าการเจริญไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงว่าสายพันธุ์ LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 สามารถเจริญได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และอาหารเลี้ยงเชื้อ SPY2 (ตาราง 16)

จากการศึกษาการเจริญโดยการนับจำนวนแบคทีเรียแลกติก (log_{10}CFU/ml) สายพันธุ์ LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และอาหารเลี้ยงเชื้อ SPY2 ที่ระยะเวลา 6, 12, 24 และ 36 ชม. ก็ให้ผลการเจริญสอดคล้องกับการวัดค่าการดูดกลืนแสง จะเห็นได้ว่า แบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับอาหารมังสวิรัติ (ตาราง 17) จากการทดลองของ Heenan *et al.*, (2000) ทำการศึกษาการเจริญของ

แบคทีเรียแลกติก คือ *Lactobacillus acidophilus* (MJLA-1 และ La-5), *L. paracasei* (LCSH-1 และ O1) และ *Bifidobacterium lactis* (BDBB2 และ Bb-12) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด คือ อาหาร SPY1, SPY2 และ SPY3 มี soy peptone, glucose monohydrate และ yeast extract ในปริมาณที่แตกต่างกัน ส่วนอาหาร SPY4 ประกอบด้วย SPY2 ผสมกับ KH_2PO_4, Na_2HPO_4 และ SPY5 ประกอบด้วย SPY2 ผสมกับ inulin พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด เหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ MRS broth พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ SPY2 สามารถทำให้เชื้อเจริญได้ดีกว่าใน MRS broth

ตาราง 16 การเจริญที่ระยะเวลาต่างๆของแบคทีเรียแลกติกในอาหารที่ปราศจากเนื้อสัตว์ (SPY2) เปรียบเทียบกับอาหาร MRS (O.D. ที่ 660 nm)

รหัสเชื้อ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ระยะเวลาต่างๆ							
	6 ชม.		12 ชม.		24 ชม.		36 ชม.	
	MRS	SPY2	MRS	SPY2	MRS	SPY2	MRS	SPY2
LA1[1]	1.20[a]	1.19[a]	3.43[a]	3.40[a]	7.92[a]	7.90[a]	7.93[a]	7.91[a]
LA6	1.42[a]	1.40[a]	3.15[a]	3.12[a]	4.60[a]	4.58[a]	4.62[a]	4.59[a]
LA13	3.10[a]	3.09[a]	5.60[a]	5.59[a]	8.58[a]	8.56[a]	8.58[a]	8.57[a]
LA71	3.25[a]	3.29[a]	6.30[a]	6.29[a]	7.00[a]	6.99[a]	7.03[a]	7.00[a]
LA102	3.10[a]	3.07[a]	4.62[a]	4.60[a]	7.35[a]	7.34[a]	7.36[a]	7.34[a]
LA198	3.10[a]	3.08[a]	3.43[a]	3.41[a]	5.98[a]	9.97[a]	5.99[a]	5.98[a]

[1] คือ เชื้อที่แยกได้จากนมเปรี้ยวที่จำหน่ายตามท้องตลาดใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

ตัวอักษรแนวนอนที่เหมือนกันในแต่ละชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากที่กล่าวมาทั้งหมดสามารถสรุปสมบัติของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 ซึ่งมีสมบัติดีกว่าแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากนมเปรี้ยวที่จำหน่ายตามท้องตลาด (LA1) ดังนี้ คือ สามารถทนต่อกรดที่ระดับ pH 1, 2, 3, 4 และ 5 สามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้ง 13 สายพันธุ์โดยวิธี agar spot สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้ง 13 สายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกันซึ่งมีร้อยละการยับยั้งอยู่ระหว่าง 80-100 ความสามารถในการอยู่รอดที่ระดับ pH 2, 3 และ 4 และความสามารถในการเจริญในอาหารที่ปราศจากเนื้อสัตว์ และสายพันธุ์ LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 มีสมบัติใกล้เคียงกับแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากนมเปรี้ยวที่จำหน่ายตามท้องตลาด (LA1) ดังนี้ คือ สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.15 หรือ 0.30 สามารถในการย่อยโปรตีน หรือไขมัน หรือแป้ง สามารถในการเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน สามารถในการเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามินบี 12 การดื้อและไวต่อยาปฏิชีวนะ จะเห็นได้ว่า LA71 มีสมบัติการเป็นโปรไบโอติกดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆ อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จึงมีสมบัติที่ทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการว่าเหมาะสมสำหรับใช้เป็นโปรไบโอติก

4. การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

นำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.9 มาศึกษาการเจริญใน MRS broth พบว่า เชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์มี lag phase เท่ากัน คือ ประมาณ 3 ชม. เจริญเข้าสู่ log phase จนถึงชม. ที่ 18 *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ LA71 มีค่า generation time เป็น 2.25 ชม. และมีค่า specific growth rate เป็น 0.31 ชม.$^{-1}$ แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ LA71 สามารถเจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆ เชื้อทุกสายพันธุ์เจริญเข้าสู่ stationary phase ชม. ที่ 21-28 และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อเหล่านี้กับแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากนมเปรี้ยวที่จำหน่ายตามท้องตลาด (LA1) พบว่า สายพันธุ์ LA71 สามารถเจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์ LA1 สายพันธุ์ LA13 สามารถเจริญได้ดีเท่ากับสายพันธุ์ LA1 สายพันธุ์ LA6 เจริญได้ดีเท่ากับ LA102 แต่เจริญได้น้อยกว่าสายพันธุ์ LA1 และสายพันธุ์ LA198 เจริญน้อยกว่า

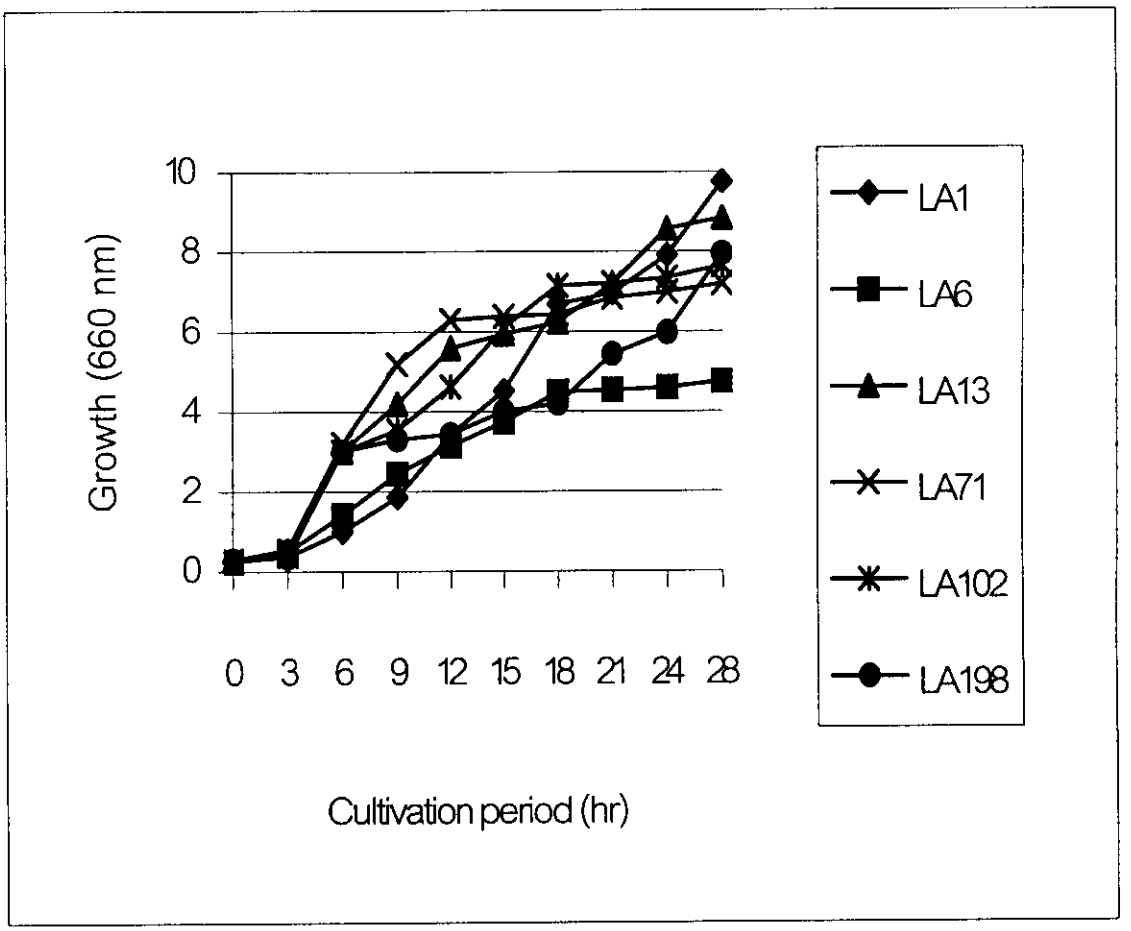
สายพันธุ์อื่นๆ (ภาพประกอบ 8 และตาราง 18) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ วิลาวัณย์ อัจจิมากุล (2524) ได้คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการทดลองเสริมอาหารสุกรในรูปเชื้อแห้งได้ 6 สายพันธุ์ คือ Lactobacillus (I9, K2, P6, T20, N1 และ T2) ซึ่งแยกได้จากมูลสุกรและเทียบเคียงชนิดพบว่าเป็น *L.plantarum* ที่สามารถเจริญได้เร็วเมื่อเทียบกับ Lactobacillus สายพันธุ์อื่นๆอีกหลายชนิด

ตาราง 17 การเจริญของแบคทีเรียแลกติกในอาหารที่ปราศจากเนื้อสัตว์ (SPY2) เปรียบเทียบกับอาหาร MRS (log_{10}CFU/ml)

รหัสเชื้อ	จำนวนแบคทีเรียแลกติก (log_{10}CFU/ml) ที่ระยะเวลาต่างๆ							
	6 ชม.		12 ชม.		24 ชม.		36 ชม.	
	MRS	SPY2	MRS	SPY2	MRS	SPY2	MRS	SPY2
LA1[1]	6.24[a]	8.23[a]	7.26[a]	7.25[a]	8.28[a]	8.28[a]	8.28[a]	8.28[a]
LA6	6.24[a]	8.23[a]	7.25[a]	7.25[a]	8.27[a]	8.28[a]	8.27[a]	8.28[a]
LA13	6.20[a]	8.20[a]	7.23[a]	7.22[a]	8.26[a]	8.26[a]	8.26[a]	8.26[a]
LA71	6.29[a]	8.28[a]	7.30[a]	7.29[a]	8.32[a]	8.32[a]	8.32[a]	8.32[a]
LA102	6.15[a]	6.13[a]	7.18[a]	7.17[a]	8.20[a]	8.20[a]	8.21[a]	8.20[a]
LA198	6.18[a]	6.18[a]	7.20[a]	7.20[a]	8.23[a]	8.23[a]	8.24[a]	8.24[a]

[1] คือ เชื้อที่แยกได้จากนมเปรี้ยวที่จำหน่ายตามท้องตลาดใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

ตัวอักษรแนวนอนที่เหมือนกันในแต่ละชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ภาพประกอบ 8 การเจริญของแบคทีเรียแลกติก

5. การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติก

นำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ที่มีสมบัติการเป็นโปรไบโอติกมาทำการศึกษาลักษณะต่างๆ เมื่อเทียบเคียงชนิดตาม Bergey 's manual determinative bacteriology volume 2 (Kandler and Weiss, 1986) และ Lactic acid bacteria (Salminen and Wright, 1993) พบว่า เชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี (ตาราง 19) ประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้ (ตาราง 20)

ตาราง 18 generation time และ specific growth rate ของแบคทีเรียแลกติก

เชื้อแบคทีเรียแลกติก	generation time (GT) (hr)	Specific growth rate (μ)[1] (hr^{-1})
LA1[2]	3.00	0.23
LA6	3.00	0.23
LA13	2.75	0.25
LA71	2.25	0.31
LA102	2.75	0.25
LA198	2.83	0.24

[1] $\mu = \frac{0.693}{GT}$

[2] คือ เชื้อที่แยกจากนมเปรี้ยวที่จำหน่ายตามท้องตลาดใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

1. Obligately homofermentative lactobacilli มี 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus delbrueckii* (LA198) แยกได้จากกุ้งส้ม
2. Facultative heterofermentative lactobacilli มี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus casei* (LA13) และ *Lactobacillus plantarum* (LA71) แยกได้จากแหนม และ *Lactobacillus plantarum* (LA102) แยกได้จากปลาร้า
3. *Pediococcus pentosaceus* (LA6) 1 สายพันธุ์ แยกได้จากแหนม (ภาพประกอบ 9)

ส่วนแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากนมเปรี้ยวที่จำหน่ายตามท้องตลาด ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ คือ *L.casei* (LA1) จะเห็นได้ว่าอาหารหมักของไทยสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกได้หลายชนิด โดยมีการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากไส้กรอกเปรี้ยวได้ 83 สายพันธุ์ เป็น Lactobacillus 57 สายพันธุ์ และ Pediococcus 26 สายพันธุ์ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และอังคณา สุขบุญ, 2541) และการแยก Lactobacillus จากนมเปรี้ยว 5 ยี่ห้อเป็น *L. casei*

2 สายพันธุ์ *L. acidophilus* 2 สายพันธุ์ และ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 1 สายพันธุ์ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2539) นอกจากนี้วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และอุบลวรรณ รอดประดิษฐ์ (2540) แยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักของไทย 52 ตัวอย่าง ได้เชื้อ 80 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร ได้ 20 สายพันธุ์เมื่อเทียบเคียงชนิดพบว่าเป็น *Lactobaillus plantarum* 16 สายพันธุ์ *L. bulgaricus* 80 สาย-พันธุ์ และ *L. brevis* 1 สายพันธุ์ และจากการทดลองของวรรณศิลป์ โรจนวงศ์ชัย และศิ-ริลักษณ์ พันโญศรัณยา (2542) มีการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักพื้นบ้าน 7 ชนิด คือ แหนม ไส้กรอกอีสาน ปลาร้า กุ้งส้ม ปลาแป้งแดง หน่อไม้ดอง และผักเสี้ยนดอง เทียบเคียงชนิดพบว่าเป็น *Lactobacillus* spp. (homofermentative) 18 สายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักพื้นบ้าน 329 ตัวอย่าง สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารได้ 10 สายพันธุ์ เป็น *Lactobacillus* spp.ทั้งหมด คือ *L. plantarum* 6 สายพันธุ์ *L. brevis* 2 สายพันธุ์ และ *L. fermentum* 2 สายพันธุ์ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2543)

ตาราง 19 การศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียแลกติก

ลักษณะที่ศึกษา	รหัสแบคทีเรียแลกติก					
	LA1[1]	LA6	LA13	LA71	LA102	LA198
<u>การเทียบเคียงในระดับจีนัส</u>						
1. การเจริญที่ 10 °C	-	-	-	-	-	-
การเจริญที่ 45 °C	-	+	-	-	-	+
2. การเจริญในร้อยละ 6.5 NaCl	+	+	+	+	+	+
การเจริญในร้อยละ 18 NaCl	-	-	-	+	+	+
3. การเจริญที่ pH 4.4	+	+	+	+	+	+
การเจริญที่ pH 9.6	-	+	-	-	-	-

ตาราง 19 (ต่อ)

ลักษณะที่ศึกษา	รหัสแบคทีเรียแลกติก					
	LA1[1]	LA6	LA13	LA71	LA102	LA198
4. Tetrad formation	-	+	-	-	-	-
5. การหมักคาร์โบไฮเดรต						
- ribose (pentose)	+	+	+	+	+	-
- glucose (hexose)	+	+	+	+	+	+
<u>การเทียบเคียงในระดับสปีชีส์</u>						
1. การหมักคาร์โบไฮเดรต						
- amygdalin	+	+	+	+	+	-
- arabinose	-	+	+	+	+	-
- cellobiose	+	+	+	+	+	-
- esculin	+	+	+	+	+	-
- fructose	+	+	+	+	+	+
- galactose	+	+	+	+	+	-
- lactose	+	-	+	+	+	+
- maltose	+	+	+	+	+	-
- mannitol	+	-	+	+	+	-
- raffinose	-	-	-	+	+	-
- rhamnose	-	-	+	-	-	-
- sorbitol	+	-	+	+	+	+
- sucrose	+	-	+	+	+	-
- trehalose	+	+	+	+	+	-

ตาราง 19 (ต่อ)

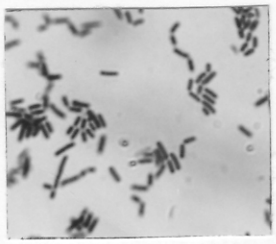
ลักษณะที่ศึกษา	รหัสแบคทีเรียแลกติก					
	LA1[1]	LA6	LA13	LA71	LA102	LA198
2. การเจริญที่ 35 °C	+	+	+	+	+	+
การเจริญที่ 40 °C	+	+	+	+	+	+
การเจริญที่ 50 °C	-	-	-	-	-	-
3. การเจริญในร้อยละ 4 NaCl	+	+	+	+	+	+
4. การเจริญที่ pH 4.2	+	+	+	+	+	+
การเจริญที่ pH 7.5	+	+	+	+	+	+
การเจริญที่ pH 8.5	+	+	+	+	+	+

- คือ ให้ผลลบ + คือ ให้ผลบวก

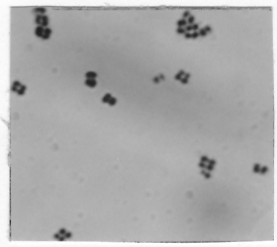
[1] คือ เชื้อที่แยกได้จากนมเปรี้ยวที่จำหน่ายตามท้องตลาดใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

ตาราง 20 การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติก

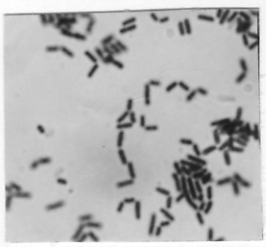
รหัสเชื้อ	ชนิดของแบคทีเรียแลกติก	แยกได้จากอาหารหมัก
LA6	*Pediococcus pentosaceus*	แหนม
LA13	*Lactobacillus casei*	แหนม
LA71	*Lactobacillus plantarum*	แหนม
LA102	*Lactobacillus plantarum*	ปลาร้า
LA198	*Lactobacillus delbrueckii*	กุ้งส้ม



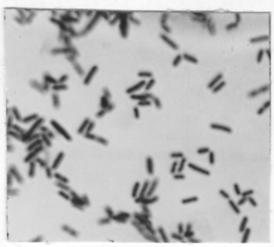
LA1



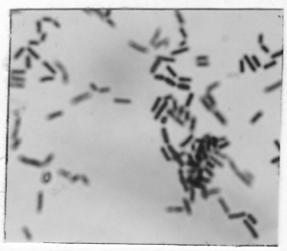
LA6



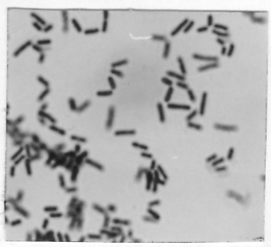
LA13



LA71



LA102



LA198

ภาพประกอบ 9 ลักษณะรูปร่าง และการติดสีแกรมของแบคทีเรียแลกติก