วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 28:3(1-8)

สมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ซึ่งคัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพง

Probiotic properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria Isolated from seabass gastrointestinal tract

คมแข พิลาสมบัติ[1] จุฑารัตน์ เศรษฐกุล[1] และอดิศร เสวตวิวัฒน์[2]

บทคัดย่อ

แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Sb2 ซึ่งแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพง มีคุณสมบัติในการสร้างสารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก โดยศึกษาความสามารถในการเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซินในสภาวะความเป็นกรดและด่างระหว่าง 3-10 ความสามารถในการเจริญในน้ำดีสังเคราะห์ (bile salts) ความเข้มข้น 0.3, 0.6 และ 0.9 เปอร์เซ็นต์ และในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ ศึกษาคุณสมบัติการต้านทานยาปฏิชีวนะ ผลการทดลองพบว่า ไอโซเลท Sb2 สามารถเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซิน เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะความเป็นกรดและด่าง 3-10 โซเดียมคลอไรด์ 1-5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเลี้ยงเชื้อในน้ำดีสังเคราะห์ 0.3 เปอร์เซ็นต์ เชื้อสามารถเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซินได้มากที่สุด ที่ความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 6 (12,800 AU/ml) โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (12,800 AU/ml) นอกจากนี้ไอโซเลท Sb2 ยังมีคุณสมบัติในการต้านทานยา gentamycin, kanamycin, naldixic acid, neomycin, norfloxacin, oxolinic acid และ sulfamethoxazole/trimethoprim

คำสำคัญ : แบคทีเรียกรดแลกติก สารแบคเทอริโอซิน ระบบทางเดินอาหารปลากะพง

Abstract

Lactic acid bacteria isolate Sb2 was isolated from gastrointestinal tract of seabass (*Lates calcarifer*). This strain was able to produce bacteriocin which inhibit several gram positive and gram negative bacteria. According to the results, probiotic properties were carried out. Strain survival *in vitro* study and bacteriocin activity were performed in pH range of 3-10, concentration of bile salts at 0.3, 0.6 and 0.9% and concentration of NaCl at 1-5%. In addition, antibiotic resistance of isolate Sb2 was determined. The results found that, lactic acid bacteria isolate Sb2 was able to grow and produce bacteriocin when cultured in pH 3-10, NaCl 1-5% and bile salts 0.3%. The maximum bacteriocin activity at pH 6 (12,800 AU/ml) and 1%NaCl (12,800 AU/ml) were observed. Moreover, isolate Sb2 was resistant to gentamycin, kanamycin, naldixic acid, neomycin, norfloxacin, oxolinic acid and sulfamethoxazole/trimethoprim.

Keywords : Lactic acid bacteria, Bacteriocin, Saebass gastrointestinal tract

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง กรุงเทพ 10520

[2]สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง กรุงเทพ 10520

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

แบคทีเรียกรดแลกติก (Lactic acid bacteria; LAB) เป็นแบคทีเรียที่พบโดยทั่วไปตามธรรมชาติ (Herreros *et al.*, 2005) และในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ (Pilasombut, 2006) โดยพบว่าบางสายพันธุ์สามารถยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ๆ ทั้งพวกที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียและพวกที่ก่อให้เกิดโรค เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ โดยสารส่วนใหญ่ที่สร้างออกมาเป็นกรดแลกติก และกรดอะซิติก นอกจากนี้ยังมีสารชนิดอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นในปริมาณน้อย แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เช่นกัน ได้แก่ กรดฟอร์มิก กรดไขมันอิสระ แอมโมเนีย เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซีทิล อะซีโตอิน อะซีทัลดีไฮด์ เบนโซเอต เอนไซม์ที่มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก และแบคเทอริโอซิน (Franz *et al.*, 1998) แบคเทอริโอซินเป็นสารโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียหลายชนิด (Muyanja *et al.*, 2002) แบคทีเรียกรดแลกติกมีประโยชน์อย่างมากในการใช้เป็นโปรไบโอติก ซึ่งโปรไบโอติกคือจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิต เมื่อรับประทานเข้าไปแล้วจะช่วยปรับความสมดุลของระบบทางเดินอาหาร (Ringø and Gatesoup, 1998) แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Sb2 ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพง (Seabass) มีลักษณะรูปร่างกลม แกรมบวก ไม่สร้าง catalase มีคุณสมบัติในการสร้างสารแบคเทอริโอซินที่ สามารถยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^{T}, *Lb. sakei* TISTR 890, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TISTR 1344, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^{T}, *Leu. mesenteroides* TISTR 942, *Bacillus coagulans* JCM 257^{T}, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Brochotrix campestris* NBRC 11547, *Pseudomonas fluorescens* JCM 5693^{T}, *Ps. fluorescens* TISTR 358, *Enterococcus faecalis* JCM 5803^{T}, *E. faecalis* TISTR 888, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Streptococcus* sp. TISTR 1030 (Rumjuankiat *et al.*, 2009) ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการทดลองครั้งนี้ เพื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของไอโซเลท Sb2 เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Sb2 คัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพง เลี้ยงในอาหาร MRS (De Man-Rogosa and Sharpe; Merck, Germany) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ (Prolabo, Belgium) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของไอโซเลท Sb2

การทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซิน เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะเป็นกรดและด่าง น้ำดีสังเคราะห์และโซเดียมคลอไรด์

นำแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Sb2 จาก stock culture มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยเชื้อเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 11.20 logCFU/ml ที่ปรับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ในการทดสอบเชื้อในน้ำดีสังเคราะห์โดยเตรียมอาหาร MRS ผสมน้ำดีสังเคราะห์จนความเข้มข้นสุดท้าย 0, 0.3 และ 0.9 เปอร์เซ็นต์ (w/v)และเตรียมอาหาร MRS ผสมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะต่าง ๆ จากนั้นนำมาหาจำนวนเชื้อโดยการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ส่วนการทดสอบเพื่อหาค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินใช้วิธี spot-on-lawn ทำโดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีวุ้น (Criterion, U.S.A.) 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดสอบ (*Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (ประมาณ 10^7 CFU/ml) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันที่มีวุ้น 0.8-1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่หลอมตัวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ รอให้อาหารแข็งตัว จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท Sb2 มาทำการปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสปรับค่า ความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 6 แล้วกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Pall, U.S.A) ทำให้เจือจางลงครั้งละ 2 เท่าอย่างต่อเนื่องกันด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ นำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสแต่ละความเจือจางปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าของอาหารที่มีเชื้อทดสอบเตรียมไว้ หลังจากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลให้ดูจากบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นจากผลการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบในแต่ละความเจือจางที่หยดลงไป (Ennahar *et al.*, 1999) ซึ่งสามารถคำนวณค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่อยู่ในน้ำส่วนใสต่อแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดเป็น arbitrary unit (AU/ml) โดยคำนวณได้จาก (1000/10)D เมื่อ D เท่ากับค่าความเจือจางสูงสุดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใส (Parente *et al.*,1995)

2.2 การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะทำตามวิธีการของ Quinn *et al.* (1994) โดยถ่ายเชื้อ ไอโซเลท Sb2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเพื่อให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland มาตรฐาน ทำการ swab เชื้อลงบนอาหารแข็ง MRS จนทั่วทั้งจานเพาะเชื้อ จากนั้นวางแผ่นยาปฏิชีวนะ (Table 1) ลงบนอาหารที่มีเชื้ออยู่ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน แล้วแสดงผลเป็น Susceptible (S), Intermediate (I) หรือ Resistant (R) ต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งค่ามาตรฐานแสดงไว้ใน Table 1

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซิน เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน

เมื่อนำไอโซเลท Sb2 มาทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซิน โดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ พบว่า ไอโซเลท Sb2 มีจำนวนเซลล์และมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินต่อแบคทีเรียทดสอบเพิ่มมากขึ้นตามระดับของค่าความเป็นกรด-ด่างสูงขึ้น (3.0-6.0) โดยสามารถเจริญเติบโตและมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินต่อแบคทีเรียทดสอบมากที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.0 ซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 12.28 log CFU/ml (OD_{600} เท่ากับ 2.05) และมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 12,800 AU/ml แต่เมื่อค่าความเป็นกรดด่างสูงขึ้น (7.0-10.0) พบว่าความสามารถในการเจริญเติบโตและค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินลดลงตามระดับค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงขึ้น (มากกว่า 6) (Figure 1) แบคทีเรียกรดแลกติกที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ปริมาณของแบคทีเรียจะมีค่าลดลง เนื่องจากเซลล์เซลล์ชะลอหรือเจริญเติบโตได้ไม่ดี ซึ่งจะส่งผลทำให้แบคทีเรียกรดแลกติกหยุดการสร้างแบคเทอริโอซิน (Zamfir *et al.*, 2000)

2. การทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซินของไอโซเลท Sb2 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน

เมื่อนำไอโซเลท Sb2 มาทดสอบความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นต่างๆ ของโซเดียมคลอไรด์ พบว่า ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการเจริญเติบโตมากที่สุด เท่ากับ 9.46 logCFU/ml (OD_{600} เท่ากับ 1.63) และมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงที่สุด เท่ากับ 12,800 AU/ml และเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่สูงเพิ่มขึ้น (2-5 เปอร์เซ็นต์) พบว่าทั้งค่า OD 600 nm จำนวนเซลล์และค่ากิจกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของแบคเทอริโอซิน มีค่าลดลงตามลำดับ อย่างไรก็ตามไอโซเลท Sb2 สามารถทนโซเดียมคลอไรด์ได้ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 1-5 เปอร์เซ็นต์ (Figure 2) โดย Verluyten *et al.* (2004) รายงานว่า การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกในสภาพที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่ำ ๆ (1-2 เปอร์เซ็นต์) สามารถเพิ่มการเจริญของเชื้อได้ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า มีการผลิตสารแบคเทอริโอซินที่เพิ่มขึ้นในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่ำ ๆ ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์จะไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตในบางครั้ง แต่มีผลต่อการผลิตสารแบคเทอริโอซินเนื่องจากโซเดียมคลอไรด์จะไปรบกวนโดยการเข้าจับกับ induction factor (IF) ของตัวรับ จากนั้น IF ก็จะถูกขับออกมาและไปจับกับตัวรับของแบคเทอริโอซิน

3. การทดสอบความสามารถในการเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซินของไอโซเลท Sb2 เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีต่อน้ำดีสังเคราะห์

เมื่อนำไอโซเลท Sb2 มาทดสอบความสามารถในการทนต่อน้ำดีสังเคราะห์ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ที่ความเข้มข้นของน้ำดีสังเคราะห์ 0.3 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความขุ่น (OD 600 nm) 0.17 มีค่าการเจริญเติบโต เท่ากับ 3.79 log CFU/ml และมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 200AU/ml ส่วนที่ความเข้มข้นของ bile salts 0.6-0.9 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบค่าการเจริญเติบโตของเชื้อไอโซเลท Sb2 (Figure 3)อย่างไรก็ตาม คมแข และคณะ (2553) ได้ทดสอบการเจริญของเชื้อ *Lactobacillussalivarius*K4ที่แยกได้จากลำไส้ไก่ พบว่าไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีน้ำดีสังเคราะห์ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Narakaew *et al.* (2009) ได้ทดสอบการเจริญของเชื้อ *Lactoba-cillus salivarius* K7 ในสภาวะที่มีน้ำดีสังเคราะห์ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน พบว่าเชื้อสามารถมีชีวิตรอดได้ 27.58 เปอร์เซ็นต์ จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ในกระเพาะและลำไส้ของสัตว์จะมีทั้งกรดและ bile salts ซึ่ง bile salts นั้นจะมีความเข้มข้นสูง สามารถละลายไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้โปรตีนที่แทรกอยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์หลุดออกไป ส่วนประกอบต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ก็จะเกิดการรั่วไหลออกมา ส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด (Begley *et al.*, 2005)

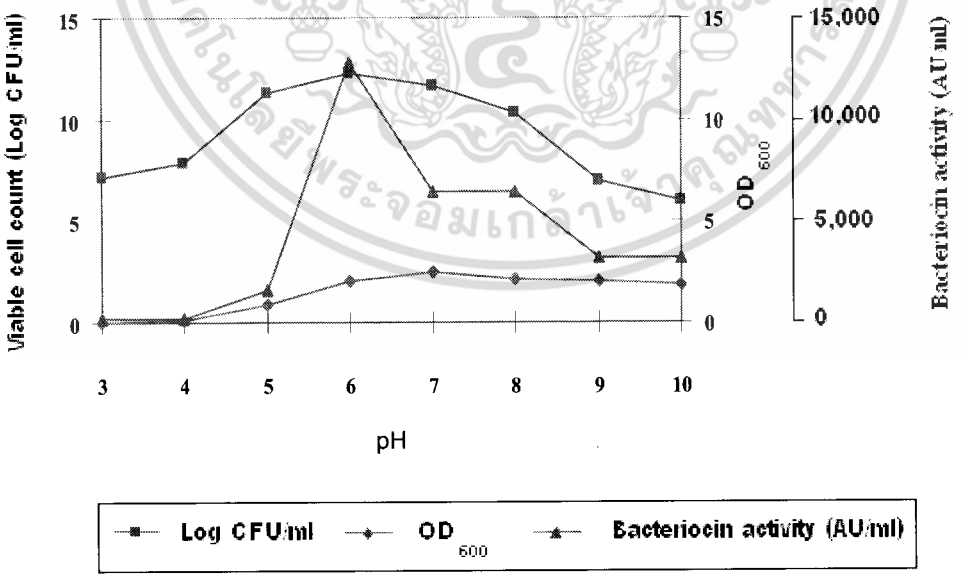

Figure1 Effect of pH on growth and bacteriocin activity of Sb2 against *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

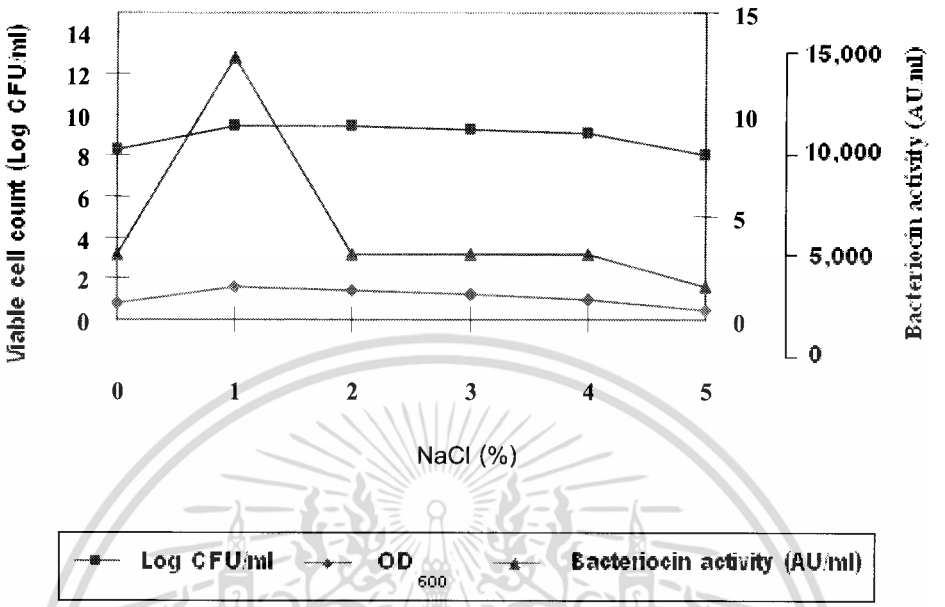

Figure 2 Effect of NaCl on growth and bacteriocin activity of Sb2 against *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM1157^T

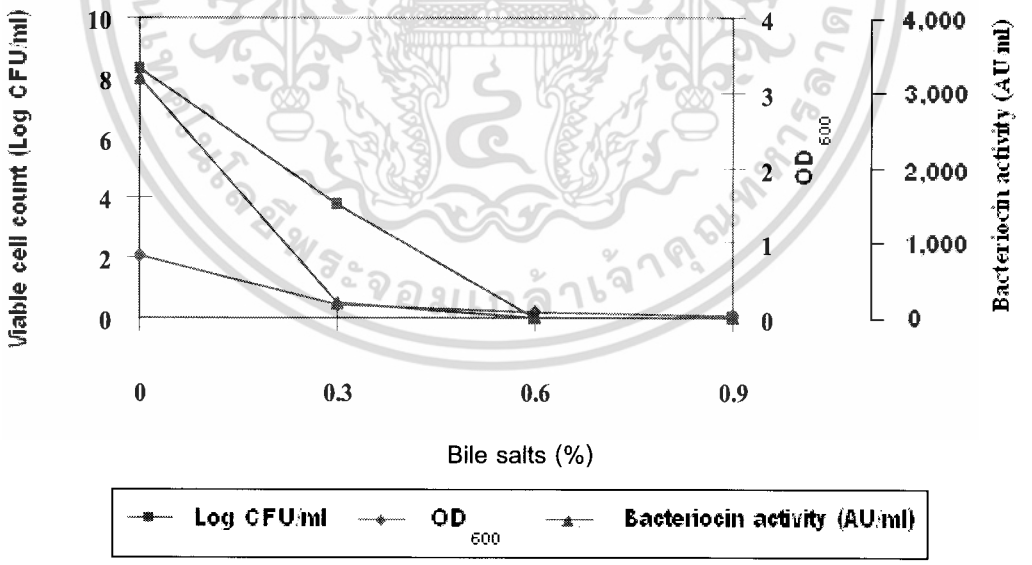

Figure 3 Effect of bile salts on growth and bacteriocin activity of Sb2 against *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ผลของการทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

ไอโซเลท Sb2 มีคุณสมบัติในการต้านทาน gentamycin, kanamycin, naldixic acid, neomycin, norfloxacin, oxolinic acid และ sulfamethoxazole/trimethoprim (Table 1) ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาถึงความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลกติกชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *Lc. lactis* subsp. *cremoris* และ *Lc. lactis* subsp. *lactis* จำนวน 26 สายพันธุ์ สามารถต้านทาน trimethoprim, sulfathiazole, gentamicin, kanamycin, lincomycin, nafcillin, neomycin, nisin, rifampin และ streptomycin (Orberg and Sandine, 1985) นอกจากนี้ *Lc. lactis* ไม่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ amikacin, ampicillin, 1st generation cephalosporin, chloramphenicol, erythromycin, gentamicin, imipenem, oxacillin, penicillin, pipericillin, sulphonamide, tetracycline, trimethoprim/sulfomethoxazole และ vancomycin (De Fabrizio *et al.*, 1994) ยาปฏิชีวนะที่ *Lc. lactis* สามารถต้านทานได้น้อย ได้แก่ carbenicillin, ciprofloxacin, dicloxacillin และ norfloxacin (Mathur and Singh, 2005) ซึ่งในปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียที่มีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะที่ใช้ในกลุ่มของปลา แต่มีการศึกษาเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Meranda and Zemelman, 2001)

ยาปฏิชีวนะ เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่สร้างโดยจุลินทรีย์ สามารถที่จะยับยั้งการเจริญหรือฆ่าจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้ ปัจจุบันยาปฏิชีวนะจะรวมถึงสารกึ่งสังเคราะห์ที่ใช้ยาปฏิชีวนะเป็นต้นแบบด้วย (อัจฉรา, 2550) ยาปฏิชีวนะบางชนิด เช่น tetracycline และ chloramphenicol มีการผสมลงในอาหารสัตว์ จะทำให้สัตว์เติบโตได้เร็วกว่าปกติรวมทั้งเพิ่มปริมาณการผลิตน้ำนม ในระยะเวลาต่อมาจึงปรากฏว่ามีการใช้ยาปฏิชีวนะเป็นอาหารเสริมเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์เลี้ยงอย่างกว้างขวาง ซึ่งบ่อยครั้งเกิดปัญหาขึ้นเนื่องจากการควบคุมที่ไม่ดีพอ การใช้ปริมาณมากเกินกว่าที่กำหนด การใช้นานเกินไปโดยไม่มีมีการหยุดใช้ยาก่อนฆ่า เป็นต้น ทำให้เกิดการตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์และเชื้อดื้อยาที่ใช้ยาบางชนิดขึ้น นอกจากนี้การที่สัตว์ได้รับยาปฏิชีวนะบ่อยเกินไป ทำให้เสียสมดุลของเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ ดังนั้นจึงต้องหาสิ่งทดแทนในลักษณะเดียวกัน คือ โปรไบโอติก ปรากฏว่าใช้เป็นสิ่งส่งเสริมในอาหารสัตว์ที่ให้ประโยชน์ได้เช่นเดียวกับยาปฏิชีวนะ แต่ไม่ก่อให้เกิดการตกค้างและการดื้อยาตามมา (สุวณีย์และมาลัย, 2536) ดังนั้นการศึกษาผลการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของไอโซเลท Sb2 จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาวิจัยในเรื่องการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก ส่วนในขั้นตอนการนำไปใช้นั้นยังต้องทำการศึกษาต่อไป

สรุปผลการทดลอง

จุดประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของไอโซเลท Sb2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ มีคุณสมบัติในการยับยั้งและทำลายแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ ไอโซเลท Sb2 สามารถเจริญและสร้างสารแบคเทอริโอซินมากที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 6 สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ช่วงความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ และน้ำดีสังเคราะห์ความเข้มข้นเท่ากับ 0.3 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการต้านทาน gentamycin, kanamycin, naldixic acid, neomycin, norfloxacin, oxolinic acid และ sulfamethoxazole/trimethoprim จึงกล่าวได้ว่าไอโซเลท Sb2 มีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็นโปรไบโอติก

กิตติกรรมประกาศ

ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ โดยความร่วมมือระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวง ศึกษาธิการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1 antibiotic resistance of isolate Sb2

Antibiotic agents	Disk Content μ)g)	Zone Diameter (mm.)			Sb 2	
		R	I	S	zone diameter (mm.)	Acceptable inhibitory
Ampicillins	10	≤11	12-13	≥14	36	S
Chloramphenicol	30	≤12	13-17	≥18	34	S
Cephalothin	30	≤14	15-17	≥18	34	S
Erythomycin	15	≤13	14-22	≥23	28	S
Gentamycin	10	≤12	13-14	≥15	0	R
Kanamycin	30	≤13	14-17	≥18	10	R
Naldixic acid	30	≤3	14-18	≥19	0	R
Neomycin	30	≤12	13-16	≥17	0	R
Nitrofurantoin	300	≤14	15-16	≥17	18	S
Norfloxacin	10	≤17	18-21	≥22	0	R
Novabincin	5	≤12	13-16	≥17	18	S
Oxolinic acid	2	≤10	-	≥11	0	R
Tetracyclin	30	≤14	15-18	≥19	38	S
Sulfamethoxazole/Trimethoprim	25/1.5	≤10	11-15	≥16	0	R
Oxytetracyclin	30	≤14	15-18	≥19	38	S

S = Susceptible I = Intermediate R = Resistant

เอกสารอ้างอิง

คมแข พิลาสมบัติ นวลพรรณ งามยี่สุ่น และอดิศร เสวตวิวัฒน์. 2553. การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lactobacillus salivarius* K4 ที่แยกได้จากลำไส้ไก่. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 28(2) : 19-28.

สุวณีย์ สุภเวชย์ และมาลัย วรจิตร .2536 .แบคทีเรียพื้นฐาน .ครั้งที่1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ศิริยอด.

อัจฉรา เพิ่ม. 2550. แบคทีเรียกรดแลคติก. ครั้งที่ 1. สงขลา : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.

Begley, M., G.M.G. Cormac and C. Hill. 2005. The interaction between bacteria and bile. FEMS Microbiol. REV.29 : 625-651.

De Fabrizio, S.V., J.L. Parada and R.A. Ledford. 1994. Antibiotic resistance of *Lactococcus lactis* - an approach of genetic determinants location through a model system. Microbiol. Aliment. Nutr. 12 : 307-315.

Ennahar, S., T. Sashihara, K. Sonomoto and A. Ishizaki. 1999. Investigation of bacteriocin production and purification from Nukadoko isolates displaying antimicrobial activity. Japanese J. Lactic Acid Bacteria. 10 : 29-36.

Franz, C.M.A.P., M. Du Toit, N.A. Olasupo, U. Schillinger and W.H. Holzapfel. 1998. Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from ready-to-eat salad. Lett. Appl. Microbiol. 26 : 231-235.

Herreros, M.A., H. Sandoval, L. González, J.M. Castro, J.M. Fresno and M.E. Tornadijo. 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats'milk cheese). Food Microbiol. 22 : 455-459.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mathur, S. and R. Singh. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. Int. J. Food Microbiol. 105 : 281-295.

Meranda, C.D. and R. Zemelman. 2001. Antibiotic resistant bacteria in fish from the Concepción Bay, Chile. Marine Pollut. Bulle. 42 : 1096-1102.

Muyanja, C.M.B.K., J.A. Narvhus, J. Treimo and T. Langsrud. 2002. Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria from busherra: a Ugandan traditional fermented veverage. Int. J. Food Microbiol. 80 : 201-210.

Narakaew, T., K. Pilasombut, N. Ngamyeesoon and A. Swetwiwathana. 2009. Preliminary characterization of *Lactobacillus salivarius* K7 for probiotic properties. Pp. 74. in: Proceeding of the 3 International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products, August 26-28, 2009; Kosa Hotel, Thailand.

Orberg, P.K. and W.E. Sandine. 1985. Survey of antimicrobial resistance in lactic streptococci. Appl. Environ. Microbiol. 49 : 538-542.

Parente, E., C. Brienza, M. Moles. and A. Ricciardi. 1995. A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. J. Microbiol. Methods. 22 : 95-108.

Pilasombut, K. 2006. Purification and characterization of bacteriocins by *Lactobacilus salivarius* K4 and K7 isolated from chicken intestine. Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Bangkok. Thailand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้