บทคัดย่อ

การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตในไก่ก่อให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อก่อโรคและเชื้ออื่นในไก่ นอกจากนี้แล้วยังมีการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงไก่ในสหภาพยุโรปและสหรัฐอเมริกา การใช้แบคเทอริโอซินจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการแก้ปัญหาดังกล่าว การทดลองครั้งนี้มีความสนใจใช้เชื้อ *Enterococcus faecium* CE5-1 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากทางเดินอาหารไก่พื้นบ้านของประเทศไทยมาศึกษาศักยภาพการเป็นโปรไบโอติก พบว่าเชื้อ *E. faecium* CE5-1 ทนได้ดีต่อสภาวะที่มีพีเอช 3.0 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และในที่มีความเข้มข้นของน้ำดีที่ 7 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แต่การเจริญจะลดลงประมาณ 2-3 log CFU/ml ภายหลังการบ่มที่พีเอช 2.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเชื้อ *E. faecium* CE5-1 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ เตตราไซคลีน อิริโทรมัยซิน เพนนิซิลลินจี และแวนโคมัยซิน นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลายส่วนใสที่ได้จากเชื้อ *E. faecium* CE5-1 แสดงกิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ *Listeria monocytogenes* DMST17303, *Pediococcus pentosaceus* 3CE27, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157 และกลุ่มของเชื้อ Enterococci ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ เมื่อศึกษาการเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อ *E. faecium* CE5-1 กับเชื้อกลุ่ม Enterococci ที่ดื้อยาปฏิชีวนะ (*E. faecalis* VanB หรือ *E. gallinarum* VanC) การเจริญของเชื้อ *E. faecalis* VanB (จาก 6.68 เหลือ 4.29 log CFU/ml) และ *E. gallinarum* VanC (จาก 6.76 เหลือ 4.31 log CFU/ml) จะลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 12 ชั่วโมงของการบ่ม จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. faecium* CE5-1 สามารถนำไปใช้เป็นเชื้อโปรไบโอติกในควบคุมการเจริญของกลุ่มของเชื้อ Enterococci ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงไก่ได้

การศึกษาคุณลักษณะของ Enterocin CE5-1 พบว่า Enterocin CE5-1 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เบื้องต้นมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อในช่วงแคบ โดยมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ เชื้อกลุ่ม *Enterococcus*, *P. pentosaceus* 4Ce27, *Bacillus cereus* DMST5040, *Staphylococcus aureus* DMST8840 และ *L. sakei* subsp. *sakei* JCM1157 นอกจากนี้ Enterocin CE5-1 มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้างตั้งแต่ 2.2-10.6 และทนต่อความร้อนตั้งแต่ 30-100 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามการเติมเอนไซม์ย่อยโปรตีน และเอนไซม์ α-amylase จะยับยั้งกิจกรรมของ Enterocin CE5-1 อย่างสมบูรณ์

การศึกษาการโคลน และแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง enterocin A สามารถตรวจพบเพียงยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินชนิด enterocin A (*ent*A gene) ในเชื้อ *E. faecium*

CE5-1 เมื่อออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *ent*A แล้วเชื่อมต่อยีน *ent*A ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR กับพลาสมิด pGEM®-T Vector แล้วจึงถ่ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้หรือพลาสมิด pGEM/*ent*A เข้าสู่เชื้อ *E. coli* JM109 ตรวจวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ent*A พบว่ายีน *ent*A จากเชื้อ *E faecium* CE5-1 มีความคล้ายคลึงกับยีน *ent*A ของพลาสมิด p5753cA จากเชื้อ *E. faecium* (NC_013317.1) ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลจาก NCBI จากนั้นเชื่อมต่อยีน *ent*A (153 bp) ที่ได้จากการตัดพลาสมิด pGEM/*ent*A ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Bam*HI กับ พลาสมิด pBS-ldh แล้วจึงถ่ายรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้หรือพล pBS-ldh/*ent*A สู่เชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JCM16167 พบว่าไม่พบเชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* JCM16167 เจริญบนอาหาร อาจเป็นเพราะโปรตีนที่ผลิตออกมามีความเป็นพิษต่อเชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* JCM16167

เมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง enterocin A ในเชื้อ *E. faecium* CE5-1 พบว่าจากนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดขนาดประมาณ 8,037 bp สามารถทำนายได้ open reading frame (ORF) อย่างน้อยประมาณ 12 ORF แต่มีเพียง 7 ORF ที่มีบทบาทต่อการสังเคราะห์ enterocin A ประกอบด้วย enterocin A structural gene (*ent*A), enterocin A immunity gene (*iment*A), induction factor of enterocin A (*ent*F), histidine protein kinase gene (*ent*K), response regulator gene (*ent*R), ABC transporter gene (*ent*T) และ accessory factor gene (*ent*D).

ABSTRACT

The use of antibiotic as growth promoter in feed for chicken causes the evolution of antibiotic resistance in both pathogen and commensal bacteria in chicken. In addition, the subtherapeutic antibiotic usage for chicken production has been banned in Europe and the United State. Using bacteriocin might be the way to solve these problems. Bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* CE5-1 was isolated from the gastrointestinal tract of Thai indigenous chickens. It was used to investigate its probiotic potential. The competition between the bacteriocin-like substance (BLS) producing probiotic strain and antibiotic-resistant enterococci was also studied. *E. faecium* CE5-1 exhibited a good tolerance to pH 3.0 after 2 h and in 7% fresh chicken bile after 6 h, but the viability of *E. faecium* CE5-1 decreased about 2-3 log CFU/ml after 2 h incubation in pH 2.5. It was susceptible to the antibiotics tested consisting of tetracycline, erytromycin, penicillin G and vancomycin. The culture supernatant of *E. faecium* CE5-1 showed activity against *Listeria monocytogenes* DMST17303, *Pediococcus pentosaceus* 3CE27, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157 and antibiotic resistant enterococci. *E. faecium* CE5-1 showed the highest inhibitory activity against two antibiotic resistant *E. faecalis* VanB (from 6.68 to 4.29 log CFU/ml) and *E. gallinarum* VanC (from 6.76 to 4.31 log CFU/ml) after 12 h of co-cultivation. The results show the future possible use of *E. faecium* CE5-1 as probiotic strain for livestock to control antibiotic-resistant enterococci.

The partially purified enterocin CE5-1 exhibited a narrow spectrum of activity against *Enterococcus* strains, *P. pentosaceus* 4Ce27, *Bacillus cereus* DMST5040, *Staphylococcus aureus* DMST8840 and *L. sakei* subsp. *sakei* JCM1157. Moreover, the bacteriocin activity of enterocin CE5-1 was active in the wide pH range (2.2-10.6) after 1 h of incubation at 37 °C and stable to heating at 30-100 °C for 15 min and 2 h of incubation. However, bacteriocin activity of enterocin CE5-1 could be inactivated when treated with proteolytic and α-amylase enzyme.

Only enterocin A gene (*ent*A) was detected in the genomic DNA of *E. faecium* CE5-1. After that the specific primers were designed based on alignment of the structural *ent*A gene. PCR products of structural *ent*A gene were cloned into pGEM-T easy vector (pGEM/*ent*A) and transformed into *E. coli* JM109. The nucleotide sequence of structural *ent*A gene was similar to a

nucleotide sequence also found in enterocin A gene of *E. faecium* plasmid p5753cA (NC_013317.1), derived from NCBI database. The 153 bp fragment was cut with *Eco*RI and *Bam*HI from pGEM/*ent*A vector and ligated with the *Eco*RI-*Bam*HI digested expression vector pBS-ldhGFP (pBS-ldh/*ent*A). After transformation of pBS-ldh/*ent*A vector into *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JCM16167, no colony was detected on the plate because the expression protein has a toxic effect to the host *L. lactis* subsp. *cremoris* JCM16167.

The sequence of a 8-kb DNA fragment of *ent*A gene cluster was determined and sequenced. The *ent*A gene cluster containing 12 open reading frame (ORF), 7 of which are predicted and obviously related to play a role in enterocin A biosynthesis consisting of enterocin A structural gene (*ent*A), enterocin A immunity gene (*iment*A), induction factor of enterocin A (*ent*F), histidine protein kinase gene (*ent*K), response regulator gene (*ent*R), ABC transporter gene (*ent*T) and accessory factor gene (*ent*D).