



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

จุลชีววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพสำหรับการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารในสัตว์

Isolation and Screening of Potential Lactic Acid Bacteria for Anti-gastrointestinal Tract Pathogens in Animal

นามผู้วิจัย นางสาวสุกานดา หมุ่มยุง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา สีสุข, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์มรณิ ด้อยเต็มวงศ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา สีสุข, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพสำหรับการยับยั้งเชื้อก่อโรค
ทางเดินอาหารในสัตว์

Isolation and Screening of Potential Lactic Acid Bacteria for Anti-gastrointestinal
Tract Pathogens in Animal

โดย

นางสาวสุกานดา หมุ่ยยุง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศุภานดา หมู่ยุ่ง 2556: การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพสำหรับการ
ยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารในสัตว์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา สีสุข, Ph.D. 125 หน้า

แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 162 ไอโซเลต จากมูลไก่ ไข่ไก่ ไข่ปลา อาหารหมัก
ดองไม้ และยอดไม้ โดยใช้อาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์
และทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรียก่อโรค ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ พบว่า
แบคทีเรียกรดแลคติก 47 ไอโซเลตยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311
ในขณะที่แบคทีเรียกรดแลคติกอีก 46 และ 45 ไอโซเลตยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC 25922 และ
Salmonella Enteritidis DMST 15676 ตามลำดับ และพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเพียง 2 ไอโซเลต
คือ SM081 และ SM154 ที่ยับยั้ง *Clostridium perfringens* ATCC 13124 ได้ แต่ไม่พบการสร้าง
เอนไซม์ไฟเตสในแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลต

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลตนี้มาศึกษาการทนกรดช่วงพีเอช 2.0-3.5 ทน
เกลือ น้ำดีเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ และทนอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียทั้งไอโซเลต
SM081 และ SM154 ทนกรดที่พีเอช 2.5 ทนเกลือ น้ำดีเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ได้นานถึง 5 ชั่วโมง
และทนอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต
SM081 และ SM154 คือ *Weissella paramesenteroides* และ *Lactobacillus plantarum* subsp.
plantarum ตามลำดับ

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Sukanda Muiyung 2013: Isolation and Screening of Potential Lactic Acid Bacteria for Anti-gastrointestinal Tract Pathogens in Animal. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Assistant Professor Nantana Srisuk, Ph.D. 125 pages.

A total of 162 lactic acid bacteria (LAB) isolated from chicken intestine and feces, sea fish intestine, fermented foods and flower or apex using MRS agar plus 0.5% CaCO₃. Anti-pathogenic activities to animal digestive tract pathogens was evaluated in all LAB isolates collected. Antagonistic assay showed that 47 LAB isolates inhibited growth of *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 whereas 46 and 45 isolates inhibited growth of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella* Enteritidis DMST 15676, respectively. These 47 LAB isolates were then screened for anticlostridial activity. Only 2 LAB isolates i.e. SM081 and SM154 were found to be antagonist against *Clostridium perfringens* ATCC 13124. However, assay for phytase activity revealed that none of them possessed phytase activity.

These two LAB were subjected to test for acid tolerance under the pH range of 2.0-3.5 as well as 0.3% bile salt tolerance and high temperature (45°C) tolerance. Results showed that both SM081 and SM154 were tolerant to pH 2.5 and 0.3% bile salt for 5h. Moreover, they were tolerant to high temperature (45°C).

Based on 16S rDNA sequence analysis, the isolates SM081 and SM154 were identified as *Weissella paramesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*, respectively.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบพระคุณ ผศ. ดร. นันทนา สีสุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ให้คำแนะนำ ปรึกษา และปรับปรุงงานวิจัย การเขียนและตรวจแก้วิทยานิพนธ์ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงด้วยดี รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์ในทุกเรื่อง เป็นอย่างดีมาโดยตลอด ขอกราบพระคุณ รศ. ดร. ณรณี ต้อยเต็มวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยให้คำแนะนำปรึกษา และกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด ขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. สุรางค์ สุทธิราช และ รศ. ดร. อติสร เสวตวิวัฒน์ ที่ให้คำแนะนำจนกระทั่งเล่มวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทดลอง รวมทั้งบุคลากรในภาควิชาที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

ขอขอบคุณคุณสุพัทธา เมืองสาม ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำปรึกษา และให้กำลังใจมาตลอด จนกระทั่งวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่ และน้องสาว ที่ให้การสนับสนุน ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจในการศึกษาของข้าพเจ้ามาโดยตลอด

สุกานดา หมุ่มยุง

ตุลาคม 2556

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	35
อุปกรณ์	35
วิธีการ	37
ผลและวิจารณ์	44
สรุปและข้อเสนอแนะ	92
สรุป	92
ข้อเสนอแนะ	93
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	94
ภาคผนวก	111
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	112
ภาคผนวก ข สารเคมี	116
ภาคผนวก ค ตัณฐานวิทยาของโคโคโคนี และเซลล์ของแบคทีเรีย	118
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์	122
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	125

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างแบคทีเรียไอซอินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก	22
2	การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ	45
3	ความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างและจำนวนไอโซเลตที่แยกได้	56
4	สัณฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้	59
5	การทดสอบความเป็นปฏิกิริยาของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อแบคทีเรียก่อโรคนางชนิดในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก	73
6	การทดสอบการทนต่ออุณหภูมิของไอโซเลต SM081 และ SM154	83
7	ผลการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะกรดต่าง ๆ และเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่ 37 องศาเซลเซียส	85
8	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล EzTaxon – e	91

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การหมักแบบ Homofermentation	14
2	การหมักแบบ Heterofermentation	15
3	การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์กับแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติก	39
4	การเจริญและบริเวณใส รอบโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหารแข็ง MRS ที่เติม CaCO ₃ ให้มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์	44
5	ความถี่ของรูปร่างเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้	70
6	การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อแบคทีเรียก่อโรค <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Salmonella</i> Enteritidis DMST 15676 และ <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311	78
7	ผลการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก SM081 และ SM154 ต่อ <i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	79
8	ความถี่ในการพบแบคทีเรียกรดแลคติกยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค <i>Salmonella</i> Enteritidis DMST 15676, <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 13311 และ <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	80
9	การรอดชีวิตของไอโซเลต SM081 ในสภาวะกรดต่าง ๆ และ เกลื่อน้ำดี ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่ 37 องศาเซลเซียส	88
10	การรอดชีวิตของไอโซเลต SM154 ในสภาวะกรดต่าง ๆ และ เกลื่อน้ำดี ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่ 37 องศาเซลเซียส	88
11	ลักษณะรูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต SM081 และ SM154 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	90
ภาพผนวกที่		
ง1	กราฟมาตรฐานฟอสเฟต	124

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพสำหรับการยับยั้งเชื้อก่อโรค ทางเดินอาหารในสัตว์

Isolation and Screening of Potential Lactic Acid Bacteria for Anti-gastrointestinal Tract Pathogens in Animal

คำนำ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมปศุสัตว์มีการขยายตัวเพิ่มขึ้นเพื่อตอบสนองความต้องการของประชากรที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเน้นการขยายตัวของปศุสัตว์ชนิดที่ให้ผลตอบแทนเร็ว เช่น ไก่ เป็ด สุกร เป็นต้น แต่ปัญหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและการดูดซึมสารอาหารของสัตว์เป็นสาเหตุสำคัญที่ส่งผลให้การขยายอุตสาหกรรมปศุสัตว์ชะงักงัน โดยเฉพาะสัตว์กระเพาะเดี่ยว ซึ่งแบคทีเรียก่อโรคนั้นอาจปนเปื้อนมากับวัตถุดิบอาหารสัตว์ น้ำ หรือสภาพแวดล้อมอื่น ๆ เช่น การกำจัดสิ่งปฏิกูลภายในฟาร์ม แบคทีเรียก่อโรคที่มีรายงานการระบาดในสัตว์ เช่น *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *Shigella sonnei* และ *Escherichia coli* เป็นต้น ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ และ ท้องเสียอย่างรุนแรงในสัตว์ ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้ เกษตรกรจึงจำเป็นต้องใช้สารเคมี และ ยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาอาการป่วยของสัตว์ลดอัตราการตาย และกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์ สารเหล่านี้อาจตกค้างในเนื้อและน้ำนมของสัตว์ ซึ่งทำให้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคเนื่องจากอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะในคน สหภาพยุโรปจึงมีการประกาศห้ามใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ ตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2549 เป็นต้นไป

นอกจากปัญหาเชื้อก่อโรคในสัตว์แล้ว อีกปัญหาหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อวงการปศุสัตว์ คือ การที่สัตว์ดูดซึมสารอาหารได้ไม่เต็มที่ ทำให้สัตว์โตช้า โดยเฉพาะในสัตว์กระเพาะเดี่ยว เนื่องจากวัตถุดิบหลักที่ใช้เป็นส่วนประกอบสูตรอาหารในประเทศไทย เช่น ข้าวโพด ปลายข้าว รำละเอียด และกากถั่วเหลือง เป็นต้น ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้จะมีฟอสฟอรัสสะสมในรูปของไฟเตต (phytate) ไฟเตตเป็นสารกัลเลตที่สามารถจับกับอนุมูลของโลหะ เช่น Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} และ Zn^{2+}

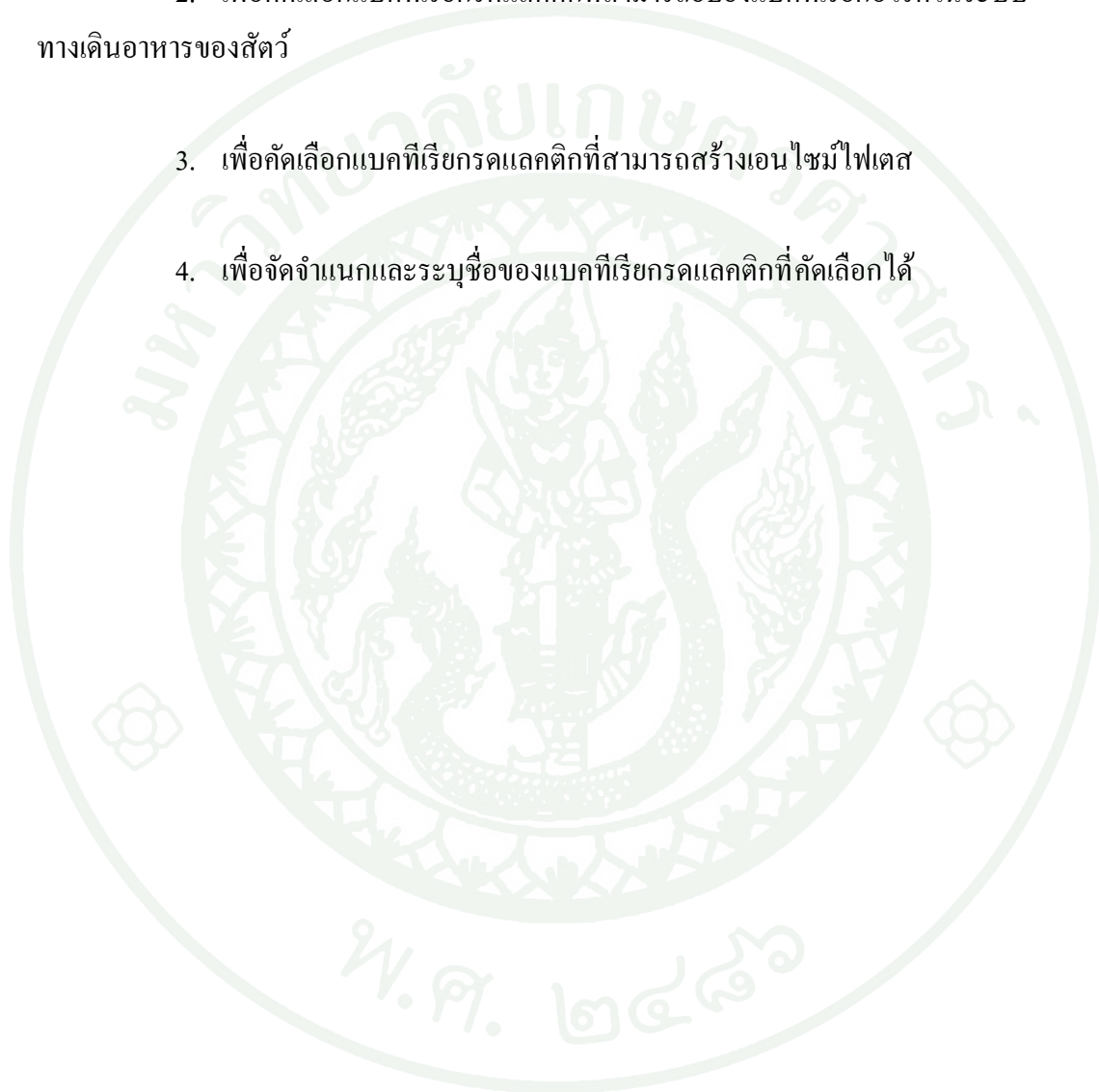
เป็นต้น จึงทำให้การดูดซึมสารอาหารเหล่านั้นลดลง เนื่องจากในสัตว์กระเพาะเดี่ยวไม่มีเอนไซม์ไฟเตส (phytase) เพื่อย่อยสลายสารไฟเตส ดังนั้นจึงมีการเติมเอนไซม์ไฟเตสลงในอาหารสัตว์ เพื่อช่วยให้สัตว์ดูดซึมสารอาหารได้มากขึ้น

การแก้ปัญหาเหล่านี้ในอุตสาหกรรมปศุสัตว์มีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นแบคทีเรียกรดแลคติกจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่ามาใช้เป็นโปรไบโอติก เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ ช่วยปรับสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ และช่วยให้สัตว์สามารถดูดซึมสารอาหารได้ดีขึ้น และเป็นการลดต้นทุนการผลิต จึงมีการศึกษาเพื่อปรับปรุงและพัฒนาวิธีการอย่างต่อเนื่อง แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบได้ทั่วไป เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง ผลิตภัณฑ์นม ลูกแป้ง ลำไส้ หรือมูลสัตว์ เป็นต้น และนอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ มีคุณสมบัติช่วยรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ และมีการศึกษาเกี่ยวกับการนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาใช้เป็นโปรไบโอติกผสมในอาหารสัตว์ โดยมีบทบาทช่วยยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยการแย่งที่เกาะ หรือแย่งอาหาร หรือทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม หรือสร้างสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เช่น กรดอินทรีย์ คาร์บอนไดออกไซด์ แอซิทาลดีไฮด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีริโอซิน และยังมีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ไฟเตสได้

ดังนั้นการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะโรคในระบบทางเดินอาหารของสัตว์และมีกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมปศุสัตว์ โดยอาจให้กินเป็นโปรไบโอติกโดยตรงหรือผสมในอาหารสัตว์ ก็จะช่วยลดปัญหาการแพร่ระบาดของแบคทีเรียก่อโรค ปรับสมดุลแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร รวมทั้งช่วยให้สัตว์สามารถดูดซึมสารอาหารได้ดีขึ้น หรือนำไปใช้ในอุตสาหกรรมนมเป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์สำหรับการผลิตนมเปรี้ยว โยเกิร์ต ในอุตสาหกรรมอาหารใช้เป็นสารกันเสียชีวภาพ หรือเป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตอาหาร ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาในการหมัก และช่วยลดแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียระหว่างการหมัก ซึ่งส่งผลให้ลดค่าใช้จ่ายในการซื้อสารเคมี นอกจากนี้ยังช่วยลดการใช้สารเคมีที่ก่อให้เกิดปัญหาสารเคมีตกค้าง ซึ่งเป็นพิษต่อผู้บริโภค

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและรวบรวมแบคทีเรียกรดแลคติก
2. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของสัตว์
3. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างเอนไซม์ไฟเตส
4. เพื่อจัดจำแนกและระบุชื่อของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้



การตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในอันดับ Lactobacillales สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งบริเวณที่มีออกซิเจน (aerobe) ไม่มีออกซิเจน (anaerobe) และมีออกซิเจนน้อย (microaerophilic) ย้อมติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนโดสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์อะตาเลส ขาดไซโตโครม ทนต่อความเป็นกรด จัดเป็นแบคทีเรียเจริญยาก (fastidious bacteria) เพราะต้องการแร่ธาตุและสารอาหารหลายชนิด เพื่อการเจริญเติบโต สามารถผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต (Axelsson, 1993) อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอชที่เหมาะสม 5.58-6.20 อัตราการเจริญจะลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกรดหรือด่าง (Salminen and von Wright, 1998) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติก มีทั้งรูปร่างกลมรูปท่อน แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดผลิตเอนไซม์อะตาเลสเทียม (pseudocatalase) ได้ ถ้าเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้นต่ำ (De Vuyst and Vandamme, 1994) แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดมีความสามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสแตกต่างกัน สามารถจำแนกลักษณะสัณฐานวิทยาตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology volume 3 (Paul *et al.*, 2009) ของแบคทีเรียกรดแลคติกได้ ดังนี้

1. วงศ์ Lactobacillaceae มีสมาชิกทั้งหมด 3 สกุล เมื่อวิเคราะห์โดยอาศัยวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA คือ สกุล *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* และ *Pediococcus* เป็นต้น ลักษณะทั่วไปมีหลายรูปร่าง ทั้งรูปท่อน คอคโคบาซิลไล หรือ กลม ส่วนใหญ่หมักเรียงต่อกันเป็นสาย ยกเว้น *Pediococcus* ที่มีการเรียงตัวเป็นคู่ หรือสี่เซลล์ (tetrads) ไม่สร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวก เมแทบอลิซึมสำหรับการหมักคาร์โบไฮเดรตได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติก นอกจากนี้ อาจมีกรดแอซิติก เอทานอล แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ กรดฟอร์มิก หรือ กรดซัคซินิก แบคทีเรียในวงศ์นี้ขาดไซโตโครม จึงไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดสและอะตาเลส ถึงแม้มีบางสายพันธุ์ที่อาจสร้างเอนไซม์อะตาเลสแบบเทียมได้

1.1 สกุล *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีลักษณะที่แตกต่างกันมากในระดับสปีชีส์ รูปร่างเซลล์มีทั้งรูปท่อนยาว ท่อนสั้น หรือ เป็นเกลียว ส่วนใหญ่หมักเรียงต่อกันเป็นสาย ไม่สร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวก สามารถเจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultatively anaerobic) สามารถพบ *Lactobacillus* ได้ในแหล่งที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง อาหารหมักดอง รวมทั้ง

อาหารเน่าเสีย และ พบในผนังเยื่อช่องปาก ลำไส้เล็ก และช่องคลอดของคน และสัตว์ (Wood and Holzapfel, 1995) ไม่ก่อให้เกิดโรคในพืชหรือสัตว์ (non-pathogenic bacteria) (Nakasawa and Hosono, 1992) สมาชิกทั้งหมดประกอบด้วย 96 สปีชีส์ ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (Stiles and Holzapfel, 1997) คือ

1. กลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซส ผลิตภัณฑ์สุดท้ายมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ เป็นกรดแลคติก ไม่เกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ โดยวิธี Embden – Meyerhof – Parnas (EMP) สร้างเอนไซม์ 1,6 bisphosphate – aldolase แต่ไม่สร้างเอนไซม์ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทส และกลูโคเนตไม่ได้ มีสมาชิกจำนวน 30 สปีชีส์

2. กลุ่ม Facultatively heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซส ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติก และไม่เกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ผ่านวิธี EMP ผลิตภัณฑ์ทั้ง aldolase และ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสได้ประกอบด้วยสมาชิกจำนวน 30 สปีชีส์

3. กลุ่ม Obligately heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซส และเพนโทสผ่านวิธีฟอสโฟกลูโคเนต ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติกเอทานอล และ แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ประกอบด้วย 36 สปีชีส์

1.2 สกุล *Paralactobacillus* ลักษณะเซลล์มีรูปร่างท่อนพอม ดิสดีแกรมบวก ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์อะคะเตเลส และ ออกซิเดส มีกระบวนการหมักเป็นแบบ homofermentation สามารถสร้างกรดแลคติกชนิด L และ D จากการหมักน้ำตาลกลูโคส มีสมาชิกเพียง 1 สปีชีส์ คือ *Paralactobacillus selangorensis*

1.3 สกุล *Pediococcus* มีสมาชิกทั้งหมด 9 สปีชีส์ เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลเดียวที่มีการแบ่งเซลล์ได้ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของครั้งแรก จะสังเกตเห็นลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์รูปร่างกลม 4 เซลล์ติดกันคล้ายสี่เหลี่ยมจัตุรัส เหมือนกันทุกเซลล์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36-1.43 ไมโครเมตร การเรียงตัวของเซลล์พบทั้งที่อยู่เดี่ยว ๆ และอยู่เป็นคู่ ไม่เกิดการขยายขนาดเซลล์ยาวออกในสภาวะไม่มีออกซิเจน เซลล์ย้อมดิสดีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ และเอนไซม์อะคะเตเลส เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultatively anaerobic) เจริญได้ที่พีเอช 5 แต่ไม่เจริญที่พีเอช 9 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 25-35 องศา

เซลเซียส มีการหมักแบบ homofermentation การหมักกลูโคสให้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ กรดแลคติก แต่ไม่สร้างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ *Pediococcus* มีบทบาทในอาหารทั้งในด้านที่ให้ประโยชน์ และโทษ เช่น *P. damnosus* เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เบียร์เกิดการเน่าเสีย ทั้งนี้เพราะขณะที่แบคทีเรียชนิดนี้เจริญจะผลิตไดอะซีทิลหรืออะซิโทอิน ส่งผลให้เบียร์มีรสชาติขม ส่วน *P. acidilactici* และ *P. pentosaceus* นิยมใช้เป็นก้ำเชื้อในการทำไส้กรอก และผักดอง (Axelsson, 1993)

2. วงศ์ Aerococcaceae ประกอบด้วย 7 สกุล เซลล์มีลักษณะรูปร่างเป็นรูปไข่ กลม คอคโคบาซิลโล พลังเซลล์มีส่วนประกอบของ diamino acid lysine ไม่สร้างสปอร์ และเอนไซม์อะคะเตเลส เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultatively anaerobic) สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์

2.1 สกุล *Aerococcus* เซลล์รูปไข่ เส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 ไมโครเมตรแบ่งเซลล์ได้ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของครั้งแรก จะสังเกตเห็นลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์รูปร่างกลม 4 เซลล์ติดกันคล้ายสี่เหลี่ยมจัตุรัสเหมือนกันทุกเซลล์ เช่นเดียวกับ *Pediococcus* ทำให้บางครั้งเกิดความสับสนในการจำแนกเชื้อ จึงจำแนกโดยการเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 6.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง *Pediococcus* ไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 6.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ *Aerococcus* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 6.5 เปอร์เซ็นต์ และไม่สร้างแก๊สเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS มีสมาชิกทั้งหมด 5 สปีชีส์

2.2 สกุล *Abiotrophia* เซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะกลม แต่อาจบางครั้งพบเซลล์รูปไข่ และรูปท่อนเจริญบนอาหาร blood agar ที่มีส่วนผสมของ pyridoxal hydrochloride เข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ หรือ cystein เข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ไม่สร้างสปอร์ ดิคลีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์อะคะเตเลสและออกซิเดส เจริญทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultatively anaerobic) การหมักกลูโคสได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ กรดแลคติก แต่ไม่สร้างแก๊สในการหมักกลูโคส ไม่สามารถเจริญได้ที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส หรือ มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 6.5 เปอร์เซ็นต์ มีเพียง 1 สปีชีส์ คือ *Abiotrophia defective*

2.3 สกุล *Dolosicoccus* เซลล์รูปไข่พบการเรียงตัวทั้งแบบเดี่ยว ๆ แบบคู่ หรือต่อกันเป็นสาย ดิคลีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ไม่สร้างเอนไซม์อะคะเตเลสและออกซิเดส เจริญทั้งที่มีและ

ไม่มีออกซิเจน (facultatively anaerobic) ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส หรือ อาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ สร้างกรดได้เล็กน้อย แต่ไม่สร้างแก๊สจากการหมักกลูโคส มีเพียง 1 สปีชีส์ คือ *Dolosicoccus paucivorans*

2.4 สกุล *Eremococcus* เซลล์รูปร่างกลม บางครั้งอาจพบมีการยี่ดียว พบทั้งที่มีการเรียงตัวเป็นเดี่ยว คู่ และเรียงตัวเป็นสายต่อกันเป็นสาย ดิคลีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์อะมิโนเอสเตอเรส และออกซิเดส เจริญทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultatively anaerobic) ไม่สามารถเจริญได้ที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส หรือ อาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ สร้างกรดได้เล็กน้อย แต่ไม่สร้างแก๊สจากการหมักกลูโคส มีเพียง 1 สปีชีส์ คือ *Eremococcus coleocola*

2.5 สกุล *Facklamia* เซลล์รูปไข่ พบการจัดเรียงตัวเป็นคู่ เป็นกลุ่ม หรือต่อกันเป็นสาย ดิคลีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์อะมิโนเอสเตอเรส และออกซิเดส เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultatively anaerobic) ไม่เจริญที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส สร้างเอนไซม์ pyrrolidonylarylamidase และ leucine aminopeptidase ได้ มีสมาชิกทั้งหมด 6 สปีชีส์

2.6 สกุล *Globicatella* ลักษณะวิทยาเหมือนกับสกุล *Facklamia* แต่สามารถสร้างเอนไซม์ pyroglutamic acid arylamidase แต่ไม่สร้างเอนไซม์ pyrrolidonylarylamidase และ leucine aminopeptidase มีสมาชิกเพียง 2 สปีชีส์ คือ *Globicatellasanguinis* และ *G. sulfidifaciens*

2.7 สกุล *Ignavigranum* เซลล์รูปไข่ พบการจัดเรียงตัวเป็นคู่ เป็นกลุ่ม หรือต่อกันเป็นสาย ดิคลีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์อะมิโนเอสเตอเรสและออกซิเดส ไม่สามารถเจริญได้ที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส ไม่สร้างแก๊สสามารถเจริญในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลลบกับการทดสอบปฏิกิริยา bile-esculin สร้างเอนไซม์ pyrrolidonylarylamidase และ leucine aminopeptidase และไวต่อยาปฏิชีวนะ vancomycin มีเพียง 1 สปีชีส์ คือ *Ignavigranum ruoffiae*

3. วงศ์ Carnobacteriaceae เซลล์รูปร่างท่อน หรือ กลม ดิคลีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ส่วนใหญ่เจริญได้ทั้งที่มี และไม่มีออกซิเจน (facultatively anaerobic) แต่มีบางสปีชีส์ที่เจริญในที่มีออกซิเจน หรือบริเวณที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย มีสมาชิกทั้งหมด 12 สกุล ดังนี้

3.1 สกุล *Canobacterium* เซลล์รูปร่างท่อนสั้น มีการจัดเรียงตัวแบบเดี่ยว ๆ แบบคู่ บางครั้งอาจพบต่อกันเป็นสาย ดิจีสแกรมบวก สร้าง predominantly L(+)-lactic acid จากการหมัก กลูโคส แต่มีเพียง *C. pleilocenium* ไม่สร้างกรดแลคติก แต่สร้างเอทานอล กรดแอซิดิก และแก๊ส คาร์บอนไดออกไซด์ สามารถเจริญทั้งที่มี และไม่มีออกซิเจน (facultatively anaerobic) เจริญได้ที่ อุณหภูมิต่ำ สปีชีส์ส่วนใหญ่เจริญได้ที่ 0 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส ไม่เจริญใน อาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ มีสมาชิกทั้งหมด 9 สปีชีส์ ซึ่งสมาชิกส่วนใหญ่แยกมาจากอาหารสัตว์

3.2 สกุล *Alkalibacterium* เซลล์มีรูปร่างท่อน พบจัดเรียงตัวแบบเซลล์เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือเป็นเกาะกันเป็นกลุ่มมากถึง 5 เซลล์ ชอบเจริญในสภาวะที่มีความเค็ม (obligately alkaliphilic) เจริญได้เฉพาะช่วงพีเอชที่มากกว่า 8 เจริญได้ถึงค่าพีเอช 11 ทนต่อความเค็ม (holotolerant) สามารถ เจริญได้ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15-17 เปอร์เซ็นต์ เป็น mesophilic คือ เจริญได้ในช่วง 35-45 องศาเซลเซียส แต่สามารถทนความเย็น (psychrotolerant) ในช่วง 4-15 องศาเซลเซียสได้ สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 20-37 องศาเซลเซียส มีสมาชิกทั้งหมด 4 สปีชีส์ ส่วนใหญ่แยกจากแหล่งธรรมชาติที่มีความเป็นด่าง

3.3 สกุล *Allofustis* เซลล์รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มี ออกซิเจน (facultatively anaerobic) มีสมาชิกเพียง 1 สปีชีส์ คือ *Allofustis semenis*

3.4 สกุล *Alloiococcus* เซลล์รูปไข่ แบ่งเซลล์ได้ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน พบการ จัดเรียงตัวเป็นคู่ เรียงสี่เซลล์ติดกัน หรือเกาะกันเป็นกลุ่มดิจีสแกรมบวก เจริญได้ในอาหารที่มี โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 6.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic) ไม่เจริญที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส มีสมาชิก เพียง 1 สปีชีส์ คือ *Alloiococcus otitis* ซึ่งแยกจากจมูก บริเวณหูชั้นกลางของมนุษย์

3.5 สกุล *Atopobacter* เซลล์รูปท่อน ดิจีสแกรมบวก เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส ไม่สร้างแก๊สแต่สร้างกรดจากการหมักกลูโคส มีสมาชิกเพียง 1 สปีชีส์ คือ *Atopobacter phocae* ซึ่งแยกได้จากปลา (Lawson et al., 2000)

3.6 สกุล *Atopococcus* เซลล์รูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น ๆ ต้องการ ออกซิเจนในการเจริญ (aerobic) ไม่สร้างเอนไซม์อะตอะเลส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ช่วง

28-32 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญได้หากสูงกว่า 32 องศาเซลเซียส มีสมาชิกเพียง 1 สปีชีส์ คือ *Atopococcus tabaci* ซึ่งแยกได้จากยาสูบ (Collins *et al.*, 2005)

3.7 สกุล *Atopotipes* เซลล์รูปท่อนสั้น ดิคลีแกรมบวกเจริญทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultatively anaerobic) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ช่วง 28-32 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเจริญได้หากสูงกว่า 32 องศาเซลเซียส มีสมาชิกเพียง 1 สปีชีส์ คือ *Atopotipes suicloacalis* ซึ่งแยกได้จากหลุมเก็บปุ๋ยคอกในสหรัฐอเมริกา (Cotta *et al.*, 2003)

3.8 สกุล *Desemzia* เซลล์รูปท่อนสั้น จัดเรียงตัวทั้งแบบเซลล์เดี่ยว ๆ แบบคู่ หรือต่อกันเป็นสายสั้น ๆ ดิคลีแกรมบวก ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญ (microaerophilic) มีสมาชิกเพียง 1 สปีชีส์ คือ *Desemzia incerta* ซึ่งแยกได้จากแมลง *Tibicen limnei*

3.9 สกุล *Dolosigranulum* เซลล์รูปไข่ พบการจัดเรียงตัวเป็นคู่ สี่เซลล์ติดกัน หรือเกาะกันเป็นกลุ่ม ดิคลีแกรมบวกเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 6.5 เปอร์เซ็นต์ เจริญที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส การทดสอบปฏิกิริยา bile-esculin ให้ผลลบ ไม่สร้างแก๊สแต่สามารถสร้างกรดได้จากการหมักกลูโคส เจริญทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultatively anaerobic) แต่สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีกว่า ปัจจุบันมีสมาชิกเพียง 1 สปีชีส์ คือ *Dolosigranulum pigrum* ซึ่งแยกจากตัวอย่างทางคลินิกของผู้ป่วยโรค Sclerosis (Aguirre *et al.*, 1993)

3.10 สกุล *Granulicatella* เซลล์รูปกลม จัดเรียงตัวทั้งแบบเซลล์เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายสั้น ๆ ไม่เจริญที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส ไม่สร้างแก๊สแต่สามารถสร้างกรดได้จากการหมักกลูโคส เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultatively anaerobic) เป็นเชื้อประจำถิ่นในร่างกายมนุษย์ พบบริเวณคอหอย ลำไส้ และ ระบบทางเดินปัสสาวะของผู้หญิง มีสมาชิกทั้งหมด 3 สปีชีส์ คือ *Granulicatella adiacens*, *G. balaenopterae* และ *G. elegans*

3.11 สกุล *Isobaculum* เซลล์รูปท่อน ดิคลีแกรมบวก เจริญที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส หรือในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 6.5 เปอร์เซ็นต์ เจริญทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน มีลักษณะวิทยาคล้ายกับ *Carnobacterium* ปัจจุบันมีสมาชิกเพียง 1 สปีชีส์ คือ *Isobaculum melis* ซึ่งแยกมาจากลำไส้ของแบคทีเรีย ซึ่งเป็นสัตว์ในตระกูลเดียวกับนาก (Collins *et al.*, 2002)

3.12 สกุล *Marinilactibacillus* เซลล์รูปท่อน เรียงตัวทั้งแบบเซลล์เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายสั้น ๆ เคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลารอบเซลล์ (peritrichous) เจริญทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน ชอบเจริญในสภาวะที่มีความเค็มเล็กน้อย มีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นเพียง 2-3.75 เปอร์เซ็นต์ แต่สามารถทนเค็มได้ถึงช่วงความเข้มข้น 17-20 เปอร์เซ็นต์ และชอบเจริญในสภาวะเป็นด่าง เจริญได้ที่ช่วงค่าพีเอช 7-10 ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 8.5 การหมักกลูโคสได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติก มากถึง 87 เปอร์เซ็นต์ ของผลิตภัณฑ์ทั้งหมด และสร้างกรดฟอร์มิก กรดแอสिटิก และ เอทานอลในอัตราส่วน 2:1:1 มีสมาชิก 2 สปีชีส์ คือ *Marinilactibacillus psychrotolerans* ซึ่งอาศัยอยู่กับฟองน้ำ สาหร่ายทะเล และ *M. piezotolerans* อาศัยอยู่ในตะกอนก้นทะเลลึก

3.13 สกุล *Trichococcus* เซลล์รูปกลม จัดเรียงตัวทั้งแบบเซลล์เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายสั้น ๆ เจริญทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน อาจพบว่าเป็นแบคทีเรีย Aerotolerant สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 23-30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.5-9 การหมักกลูโคสในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติก และกรดแอสिटิก แต่สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดแอสिटิก และเอทานอล สามารถพบได้ตามโคลนหนองน้ำ และดิน มีสมาชิกทั้งหมด 5 สปีชีส์ คือ *Trichococcus flucculiformis*, *T. collinsii*, *T. palustris*, *T. pasteurii* และ *T. patagoniensis*

4. วงศ์ Enterococcaceae เซลล์รูปกลมติดสี่แกรมบวกไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งบริเวณที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน และบริเวณที่มีออกซิเจนน้อย มีสมาชิกทั้งหมด 4 สกุล ดังนี้

4.1 สกุล *Enterococcus* เซลล์รูปกลม จัดเรียงตัวทั้งแบบเซลล์เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายสั้น ๆ เจริญเติบโตได้ทั้งบริเวณที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 35-37 องศาเซลเซียส ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส ทนสภาวะแวดล้อมที่แห้งแล้งได้ดี เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีเมแทบอลิซึมการหมักแบบ homofermentation เจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 6.5 เปอร์เซ็นต์ ทนน้ำดีได้ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ สมาชิกส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก นอกจากนี้ยังพบอยู่ร่วมกับพืชหรือน้ำได้อีกด้วย มีสมาชิกทั้งหมด 34 สปีชีส์ มีบางสปีชีส์ อาทิ *E. faecalis* เป็นเชื้อฉวยโอกาส จึงไม่นำมาใช้กับอาหาร แต่ก็มีมีการนำมาใช้เป็น โพรไบโอติกและเป็นกล้าเชื้อในการหมักฟางเป็นอาหารสัตว์ นอกจากนั้นยังเป็นแม่แบบของแบคทีเรียกรดแลคติกในการศึกษาลักษณะทาง

สรีระวิทยา เช่น ลักษณะของผนังเซลล์ (Axelsson, 1993) สำหรับ *E. faecium* มีการนำไปผลิตเป็น โปรีไบโอติก เพื่อจำหน่ายทางการค้า เนื่องจากสามารถทนต่อสภาวะเครียดในกระบวนการผลิตได้ดี (Fuller, 1989) แยกได้จากมนุษย์ อวัยวะเพศหญิง อาหาร และสิ่งแวดล้อม แต่พบมากในลำไส้ของมนุษย์ และสัตว์

4.2 สกุล *Melissococcus* เซลล์รูปร่างกลม จัดเรียงตัวทั้งแบบเซลล์เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายสั้น ๆ ไม่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน เจริญเติบโตได้ทั้งที่ไม่มีออกซิเจนและมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 1-5 เปอร์เซ็นต์ แต่หากมีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ จะยับยั้งการเจริญ มีสมาชิกเพียง 1 สปีชีส์ คือ *Melissococcus plutonius* ซึ่งแยกมาจากไรอาร์รัว หรือไรใหญ่ ซึ่งเป็นศัตรูผึ้ง (Kanbar et al., 2004) แยกได้จากรังผึ้ง

4.3 สกุล *Tetragenococcus* เซลล์รูปกลม แบ่งเซลล์ได้ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของครั้งแรก จะสังเกตเห็นเฉพาะเซลล์รูปร่างกลม 4 เซลล์ติดกัน คล้ายสี่เหลี่ยมจัตุรัสเหมือนกันทุกเซลล์ อาจพบการจัดเรียงเซลล์อยู่เป็นคู่ หรืออยู่เดี่ยว ๆ โดยเฉพาะการเจริญช่วง midexponential ดิจีสเทแกรมบวก ไม่มีไซโตโครม ไม่สร้างเอนไซม์อะซิเตสและออกซิเดส มีการหมักกลูโคสแบบ homofermentation ไม่ได้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย เจริญได้ทั้งที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ชอบเค็มปานกลาง เจริญได้ในอาหารที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 4-18 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ในช่วง 7-8 แต่ไม่เจริญที่พีเอช 4.5 ก่อนหน้านี้มีเพียงสปีชีส์เดียว คือ *T. halophilus* ซึ่งแต่เดิมจัดเป็น *P. halophilus* มีลักษณะสำคัญ คือ ทนเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้มากกว่า 18 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากแบคทีเรียกรดแลคติกอื่น ๆ จึงมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมการหมักที่มีเกลือสูง ๆ เช่น การทำซอสถั่วเหลือง เป็นต้น (Axelsson, 1993) แต่ปัจจุบันมีสมาชิกทั้งหมด 4 สปีชีส์ คือ *Tetragenococcus halophilus*, *T. muriaticus*, *T. koreensis* และ *T. solitarius*

4.4 สกุล *Vagococcus* เซลล์รูปกลม จัดเรียงตัวทั้งแบบเซลล์เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายสั้น ๆ เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน เจริญที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส มีสมาชิกทั้งหมด 4 สปีชีส์ คือ *Vagococcus fluvialis*, *V. fessus*, *V. lutrae* และ *V. salmoninarum*

5. วงศ์ *Leuconostocaceae* เซลล์รูปวงรีจนถึงรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นคู่ หรือสายสั้น ๆ เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน ไม่สร้างเอนไซม์อะมัยเลส หมักกลูโคสแบบ heterofermentation ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติก แก๊สคาร์บอนไดร็อกไซด์ กรดแอซิดิก และเอทานอล มีสมาชิกทั้งหมด 3 สกุล ดังนี้

5.1 สกุล *Leuconostoc* เซลล์รูปวงกลม สันฐานวิทยาของเซลล์ขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ ถ้าเลี้ยงบนอาหารแข็งหรือมีกลูโคสอุดมสมบูรณ์ เซลล์มักจะขยายตัวตามแนวยาว ทำให้เกิดความสับสนกับแบคทีเรียกรดแลคติกรูปท่อน (*Lactobacilli*) จัดเรียงตัวเป็นคู่ หรือเป็นสายติดลิแกมบวค เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน ถึงแม้จะพบการเจริญที่พีเอช 4.5 แต่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ชอบสภาพที่เป็นกรด เจริญได้ดีที่พีเอช 6.5 *Leuconostoc mesenteroides* จะหยุดการเจริญเมื่อพีเอชเริ่มต้นลดลงเป็น 5.4-5.7 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 20 และ 30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 5 องศาเซลเซียส การหมักกลูโคสได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติก แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอล หรือ กรดแอซิดิก ผ่านวิถี hexose-monophosphate และ phosphoketolase ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญ เจริญไม่คืบหน้าในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่เจริญได้ดีขึ้นเมื่อบ่มในสภาวะที่มีแก๊สผสมระหว่างคาร์บอนไดออกไซด์ 19.8 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจน 11.4 เปอร์เซ็นต์ และไนโตรเจน 68.8 เปอร์เซ็นต์ ในระบบการย่อยอาหารของมนุษย์และสัตว์ พบรายงานการอยู่ร่วมกันของ *Leuconostoc* และ *Weissella* ที่พบในส่วนของลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ ปัจจุบันมีสมาชิกทั้งหมด 14 สปีชีส์ เนื่องจาก *Leuconostoc paramesenteroides* มีการจัดจำแนกใหม่เป็น *Weissella paramesenteroides* (Collins et al., 1993) และ *Leuconostoc oenos* เมื่อจัดจำแนกใหม่ถูกย้ายไปอยู่ในสกุล *Oenococcus* และเรียกชื่อใหม่เป็น *Oenococcus oeni* (Dicks et al., 1995)

5.2 สกุล *Oenococcus* ลักษณะสันฐานวิทยาส่วนใหญ่เหมือนสกุล *Leuconostoc* แต่ *Oenococcus* มีทั้งสปีชีส์ที่ชอบกรด คือ *O. oeni* เจริญได้ที่พีเอช 3.5-3.8 ซึ่งแยกจากไวน์แดงที่ผลิตในอาร์เจนตินา นอกจากนี้ *O. oeni* ยังสร้างเอนไซม์ exoprotease และไม่ถูกยับยั้งด้วยเอทานอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ได้อีกด้วย (Manca de Nadra et al., 2005) และสปีชีส์ที่ไม่ชอบกรด คือ *O. kitaharae* เจริญได้ที่ช่วงพีเอช 5-7 เป็นสปีชีส์ที่แยกจากซอสญี่ปุ่น โชยุ เจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ เจริญได้ในสภาวะที่มีเอทานอล 5 เปอร์เซ็นต์ แต่ถูกยับยั้งด้วยเอทานอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ *Oenococcus* มีสมาชิกทั้งหมด 2 สปีชีส์ คือ *O. oeni* และ *O. kitaharae*

5.3 สกุล *Weissella* เซลล์มีทั้งรูปท่อนสั้นหรือกลม และจัดเรียงตัวเป็นคู่หรือสายสั้น ๆ เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน ทุกสปีชีส์หมักกลูโคสแบบ heterofermentation ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติก แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล และกรดแอซีติก การหมักคาร์โบไฮเดรตผ่านวิถี hexose-monophosphate และ phosphoketolase มีสมาชิกทั้งหมด 11 สปีชีส์ นอกจากนี้ *W. paramesenteroids* สามารถทนโซเดียมคลอไรด์ได้ดี และอาจแยกได้จากอาหารที่มีเกลือสูง ทนกรดได้ เจริญในอาหารที่มีพีเอชต่ำกว่า 5

6. วงศ์ Streptococcaceae เซลล์รูปวงรีหรือกลม ดิสดีแกรมบวกไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน อาจต้องการแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในการเจริญ และไม่สร้างเอนไซม์อะตาลเลส มีสมาชิกทั้งหมด 3 สกุล ดังนี้

6.1 สกุล *Streptococcus* เซลล์รูปปร่างกลมหรือรูปไข่ พบการจัดเรียงเป็นสาย หรือเป็นคู่ เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน บางสปีชีส์ต้องการแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในการเจริญ การหมักคาร์โบไฮเดรตผลิตกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ แต่ไม่สร้างแก๊ส ชอบเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส มีสมาชิกทั้งหมด 56 สปีชีส์

6.2 สกุล *Lactococcus* เซลล์รูปปร่างกลมหรือรูปไข่ มีการจัดเรียงตัวอยู่เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสาย ดิสดีแกรมบวก เจริญที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส เจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ทนโซเดียมคลอไรด์ได้เพียงความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ มีเมแทบอลิซึมในการหมักแบบ homofermentation มีสมาชิกทั้งหมด 5 สปีชีส์

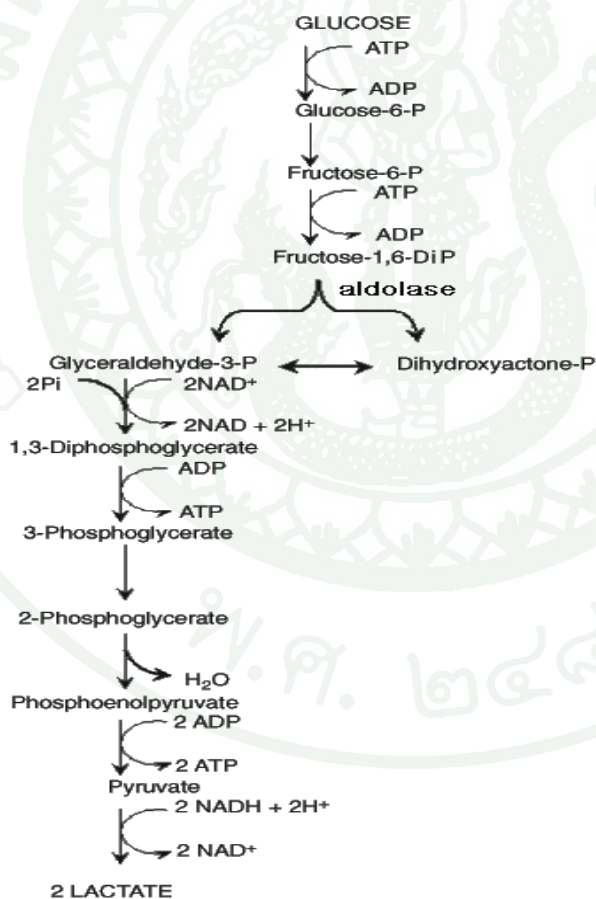
6.3 สกุล *Lactovum* เซลล์รูปไข่ จัดเรียงตัวเป็นคู่ ไม่สร้างสปอร์ ดิสดีแกรมบวก เจริญในที่ไม่มีออกซิเจนแต่ทนสภาวะที่มีออกซิเจน เป็น mesophile คือ เจริญได้ในช่วง 35-45 องศาเซลเซียส *Lactovum* ปัจจุบันมีเพียงสปีชีส์เดียว คือ *Lactovum miscens* ซึ่งแยกจากผืนป่าที่มีความเป็นกรดในประเทศเยอรมนี (Matthies et al., 2004) เจริญได้ที่พีเอช 3.5-7.5 หมักกลูโคสแบบ homofermentation

เมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกหมักน้ำตาลเฮกโซส โดยกระบวนการที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ คือ

1. Homofermentation

เมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลคติกลักษณะนี้เกิดผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ซึ่งเปลี่ยนกลูโคสแล้วได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติก เรียกแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มนี้ว่า homofermentative bacteria ซึ่งจะได้พลังงาน ATP 2 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล (Axelsson, 2004) (ภาพที่ 1)

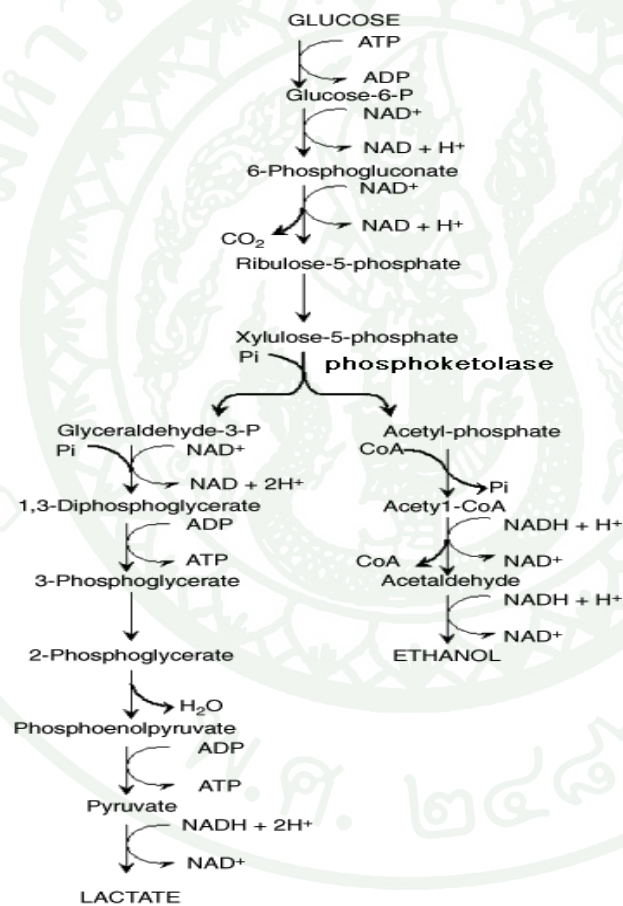


ภาพที่ 1 การหมักแบบ Homofermentation

ที่มา: Axelsson (2004)

2. Heterofermentation

เมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มนี้ดำเนินตามวิถีฟอสโฟคีโตเลส (Phosphoketolase) ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากกระบวนการหมัก คือ กรดแลคติกประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือเป็นแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล หรือ กรดอะซิติก โดยผ่านวิถี phosphoglyconate หรือ phosphoketolase และ เรียกแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มนี้ว่า heterofermentative bacteria สำหรับผลผลิตสุทธิจะได้อะตอม ATP 1 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล (Axelsson, 2004) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การหมักแบบ Heterofermentation

ที่มา: Axelsson (2004)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

1. กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์มีกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ เนื่องจากกรดอินทรีย์ทำให้สภาวะแวดล้อมรอบเซลล์ลดลง โดยโมเลกุลของกรดที่ไม่แตกตัวเป็นสาเหตุให้ค่าพีเอชภายนอกไซโตพลาสซึมเกิดสภาวะเป็นกรด เนื่องจากกรดอินทรีย์เมื่ออยู่ในรูปไม่แตกตัว จะสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ และเกิดการแตกตัวของกรดภายในเซลล์ทำให้เซลล์เกิด electrochemical proton gradient หรือทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียคุณสมบัติการเลือกผ่านของสาร (permeability) ส่งผลให้เซลล์เกิดความเสียหายและตายในที่สุด (Ammor *et al.*, 2006)

Axelsson (2004) กรดอินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก คือ กรดแลคติก และ กรดแอซิดิก ในอาหารที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกจะมีการสะสมของกรดอินทรีย์ ทำให้ค่าพีเอชของอาหารลดลง ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญทำให้แบคทีเรียกรดแลคติก ถูกนำมาใช้ในการถนอมอาหาร เนื่องจากสภาวะที่เป็นกรดจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมลบ และแกรมบวก การยับยั้งการเจริญต่อจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ ขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ค่า pKa และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ ในสภาวะที่พีเอชต่ำ กรดที่มีค่า pKa สูงจะอยู่ในรูปไม่แตกตัวมากกว่ากรดที่มีค่า pKa ต่ำ เช่น กรดแอซิดิก (pKa = 4.74) ซึ่งผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก กลุ่ม heterofermentative มีกรดอยู่ในรูปไม่แตกตัวมากกว่ากรดแลคติก (pKa = 3.85) 2-4 เท่า ที่พีเอชช่วง 4-4.6 (Lindgren and Dobogrosz, 1990) ทำให้มีผลมากกว่ากรดแลคติกการใช้กรดทั้งสองชนิดนี้ร่วมกัน สามารถลดอัตราการเจริญของ *Salmonella Typhimurium* ได้มากกว่าการใช้กรดชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว (Rubin, 1978) กลไกการทำงานของกรดอินทรีย์ เกิดจากกรดอินทรีย์ที่อยู่ในรูปไม่แตกตัว จะสามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของแบคทีเรียและเกิดการสะสมของไฮโดรเจนไอออน ทำให้พีเอชภายในเซลล์สูงกว่าภายนอกเซลล์ กรดอินทรีย์ที่สะสมภายในเซลล์จะแตกตัวให้ไฮโดรเจนไอออนเป็นจำนวนมาก ไฮโดรเจนไอออนจะไปรบกวนกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์แบคทีเรีย เช่น กระบวนการ translocation โดยไปยับยั้งการนำเข้ากรดอะมิโน ทำให้เซลล์ไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ได้ และ oxidative phosphorylation เป็นต้น แต่ยังมีจุลินทรีย์บางชนิดที่ทนต่อกรดอินทรีย์ได้ เช่น ยีสต์ รา เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรด ซึ่งปกติมีพีเอชประมาณ 5 และแบคทีเรียบางชนิดที่สร้างกรด (acid producing bacteria) เช่น *Lactobacillus*, *Streptococcus* เป็นต้น จุลินทรีย์เหล่านี้จะสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีความเป็นกรด

แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคส่วนใหญ่จะเป็น Lactobacilli เช่น *Lactobacillus sake* ที่แยกจากเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ สามารถสร้างกรดอินทรีย์มา ยับยั้งการเจริญของ *Salmonella Typhimurium* และ *Staphylococcus aureus* ได้ (Schillinger and Lucke, 1989)

Garriga *et al.* (1998) ศึกษา *Lactobacillus salivarius* ที่แยกจากกระเพาะปัสสาวะและลำไส้ ของไก่ พบว่า *L. salivarius* สร้างกรดอินทรีย์มายับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* และ *Salmonella Typhimurium* ได้ และจากการศึกษาของ Brashears and Durre (1999) พบว่า *Lactobacillus lactis* สามารถสร้างกรดอินทรีย์มายับยั้งการเจริญของ *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis* และ *S. Typhimurium* ได้ในอาหารเหลวเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน หลังจากบ่มเชื้อไว้ 24 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Salmonella sp.* เมื่อเก็บไว้ในห้องเย็น

Murry *et al.* (2004) พบว่า *Lactobacillus salivarius* และ *L. plantarum* ที่เป็นโปรไบโอติกทางการค้า สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* และ *Clostridium perfringens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตจากอาหารไก่ได้ โดยพบว่าการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าวเป็นผลสืบเนื่องมาจากการหมักคาร์โบไฮเดรต แล้วเกิดกรดแอซิติก กรดโพรไพโอนิก และ กรดแลคติกเพิ่มมากขึ้น ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง ทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถเจริญได้และลดจำนวนลง

Fayol-Messaoudi *et al.* (2005) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus johnsonii* La1, *L. rhamnosus* GG, *L. casei* Shirota YIT9029, *L. casei* DN-114 001 และ *L. rhamnosus* GR1 ช่วยลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella Typhimurium* SL1344 โดยพบว่าส่วนใสของน้ำเลี้ยงเซลล์จากช่วงการเจริญ exponential phase มีกิจกรรมการยับยั้ง *S. Typhimurium* SL1344 ได้ต่ำกว่า น้ำเลี้ยงเซลล์จากช่วง stationary phase และ ในสภาวะที่ค่าพีเอชลดต่ำลง พบการยับยั้งการเจริญ *S. Typhimurium* SL1344 ได้อย่างสมบูรณ์

De Keersmaecker *et al.* (2006) พบว่า *Lactobacillus rhamnosus* GG มีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร *Salmonella Typhimurium* และพบว่ากิจกรรมการยับยั้งโดย *L. rhamnosus* GG เกิดจากการสะสมกรดแลคติกที่สร้างโดย *L. rhamnosus* GG

2. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นผลผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งออกซิเจนจะมีผลกับเอนไซม์ flavoprotein oxidases หรือ nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) peroxidase กลไกการยับยั้งของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อาจเกิดจากการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของหมู่ซัลไฟด์ไรล (sulfhydryl group, -SH) ของโปรตีนหรือเอนไซม์ ส่งผลให้เอนไซม์เกิดความเสียหาย และทำให้เกิดปฏิกิริยา peroxidation ของไขมันที่อยู่ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้การซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์สูงขึ้น ความสามารถในการซึมผ่านเข้าและออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ ของสารต่าง ๆ จึงเสียไป (Kong and Davison, 1980) นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังเป็นสารตั้งต้นในการสร้างอนุมูลอิสระที่สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) และ อนุมูลไฮดรอกซิล (OH^\cdot) เป็นต้น ซึ่งทำให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายได้ (Byczkowski and Gessner, 1988) ในสภาวะที่มีออกซิเจนแบคทีเรียกรดแลคติกสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นตัวออกซิไดส์ที่รุนแรง (Lindgren and Dobrogosz, 1990) และมีผลต่อเซลล์แบคทีเรียทำให้โครงสร้างของกรดนิวคลีอิก และ โปรตีนในเซลล์เปลี่ยนไปจนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังรวมตัวกับสารประกอบอื่นเกิดเป็นสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในน้ำนมดิบจะรวมตัวกับไฮโดรอกซียานเนต โดยมีเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดเป็นไฮโปไฮโดรอกซียานเนต ทำให้โครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียถูกทำลาย จึงยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

Ocana *et al.* (1999) พบว่า *Lactobacillus crispatus* F117 ที่แยกจากระบบสืบพันธุ์เพศหญิงสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในระดับสูง ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้

Otero and Nader-Macias (2006) พบว่า *Lactobacillus gasseri* ซึ่งแยกจากระบบสืบพันธุ์ของลูกวัว สามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วมีฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นเชื้อฉวยโอกาสในระบบฟาร์มได้

Pridmore *et al.* (2008) พบว่า *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 ซึ่งแยกได้จากลำไส้ของคน เมื่อเลี้ยง *L. johnsonii* NCC 533 ในสภาวะที่มีออกซิเจน สามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มายับยั้ง *Salmonella* Typhimurium SL1344 ได้

Atassi and Servin (2010) พบว่าการทำงานร่วมกันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ กรดแลคติก ที่ผลิตโดย *Lactobacillus johnsonii* NCC933 และ *L. gasseri* KS120.1 ช่วยเพิ่ม ประสิทธิภาพในการฆ่า *Salmonella* Typhimurium SL1344, *Gardnerella vaginalis* DSM 4944 และ *Escherichia coli* CFT073

3. คาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์ส่วนใหญ่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีกระบวนการหมักแบบ heterofermentative กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของคาร์บอนไดออกไซด์ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อย่างไรก็ตามคาดว่าคาร์บอนไดออกไซด์อาจทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจน ซึ่งจะยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาสลายคาร์บอนไดออกไซด์และเกิดการสะสมของ คาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วเป็นสาเหตุให้เยื่อหุ้มเซลล์ทำงานผิดปกติไป สูญเสียคุณสมบัติการเลือกผ่านของสาร (Eklund, 1984) คาร์บอนไดออกไซด์ยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้หลายชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบที่ชอบเจริญในที่เย็น (Farber, 1991) คาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้นสูง ๆ ป้องกันการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคบาง ชนิดได้ เช่น *Salmonella* Typhimurium (Lindgren and Dobrogosz, 1990) โดยพบว่า คาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และ คาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้น 20-50 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของ เชื้อราได้ (Wagner and Moberg, 1989)

4. ไดอะซีติล

Jay (1982) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแกรมลบไวต่อไดอะซีติลมากกว่าแบคทีเรียแกรม บวก เนื่องจากเมื่อใช้ *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia coli* และ *Aeromonas* เป็น แบคทีเรียทดสอบ พบว่าการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Aeromonas*, *Salmonella*, *Yersinia* และ *E. coli* ใช้ไดอะซีติลที่ความเข้มข้นต่ำกว่าเมื่อต้องการยับยั้ง *Listeria* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่ง ไดอะซีติลเป็นสารประกอบหอมระเหย ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์ โดยการ หมักกรดซिटริก ไดอะซีติลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก โดยการขัดขวาง การใช้กรดอะมิโนอาร์จินีน (Jay, 1986) นอกจากนี้ยังพบว่าไดอะซีติลมีฤทธิ์ยับยั้งยีสต์ และ รา ได้ ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก กลไกการยับยั้งของไดอะซีติล คาดว่าเกิดจากการทำปฏิกิริยากับโปรตีนที่ ยึดจับตรงตำแหน่งกรดอะมิโนอาร์จินีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนหรือเอนไซม์ (Ouweland,

1998) ในปี 1999 Kang and Fung พบว่าไดอะซิติลความเข้มข้น 300 ppm ควบคุมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *Escherichia coli* O157:H7 และ *Salmonella* Typhimurium ได้

5. ริวเทอร์ริน

Ouwehand (1998) รายงานว่าริวเทอร์รินสามารถยับยั้งแบคทีเรีย รา โปรโตซัว และ ไวรัสได้ โดยจะทาปฏิกิริยากับเอนไซม์ ribonucleotide reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

Schnurer and Magnusson (2005) รายงานว่าริวเทอร์รินเป็นสารต้านจุลชีพที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ไวต่อพีเอชต่ำ เสถียรต่อความร้อน มีฤทธิ์ในการทำงานได้กว้าง และสามารถละลายได้ในอะซิโตน พบครั้งแรกจาก *Lactobacillus reuteri* โดยริวเทอร์รินเป็นสารที่ได้จากการที่แบคทีเรียกรดแลคติกออกซิไดส์กลีเซอรอลในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยทั่วไปแบคทีเรียกรดแลคติกจะไม่มีวิถี oxidation phosphorylation สำหรับกลีเซอรอล กลีเซอรอลไม่สามารถถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ดังนั้นวิธีการเดียวที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้ออกซิไดส์กลีเซอรอลได้ คือ การทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกเข้าสู่สารตัวกลางของ 3-hydroxypropionaldehyde (reuterin, 3-HPD)

Arqués *et al.* (2011) ศึกษาการใช้ริวเทอร์ริน และแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารนม พบว่าการใช้ริวเทอร์รินร่วมกับไนซิน, lacticin 481 หรือ enterocin AS-48 ช่วยเพิ่มกิจกรรมการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* แต่สำหรับ *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* Enteritidis, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* และ *Campylobacter jejuni* การใช้ริวเทอร์รินร่วมกับแบคเทอริโอซินไม่ช่วยเพิ่มกิจกรรมการยับยั้ง เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ริวเทอร์รินเพียงอย่างเดียว

6. แบคทีเรียไอซัน

แบคทีเรียไอซันเป็นสารประเภทเพปไทด์ สังเคราะห์จากไรโบโซม และหลั่งออกนอกเซลล์ ประกอบด้วยกรดอะมิโนต่อกัน ประมาณ 30-60 กรดอะมิโน สามารถฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่น ๆ ที่อยู่ในแหล่งนั้นได้ แบคทีเรียไอซันแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ คือ แบคทีเรียไอซันมีฤทธิ์ยับยั้งแคบ และยับยั้งแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันได้ (Garneau *et al.*, 2002) กลไกการยับยั้งของแบคทีเรียไอซันเกิดขึ้นบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และเกิด proton motive force ทำให้เกิดรูพรุนขึ้นไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ (Montville *et al.*, 1995) ปัจจุบันไนซิน เป็นแบคทีเรียไอซันทางการค้าที่รู้จักกันดี ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก และใช้เป็นสารกันเสียทางชีวภาพในอาหาร (Hansen, 1994) การนำแบคทีเรียไอซันไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะช่วยลดการใช้สารกันเสียที่เป็นสารเคมี รวมทั้งลดการใช้ความร้อน ทำให้อาหารยังคงอุดมไปด้วยคุณค่าของสารอาหาร มีรายงานมากมายเกี่ยวกับการสร้างแบคทีเรียไอซันโดยแบคทีเรียกรดแลคติก ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก	การออกฤทธิ์ยับยั้ง
<i>Lactococcus</i> sp.	
nisin	กว้าง
lacticin 3147	กว้าง
lacticin 481	ปานกลาง
lactococcin A, B และ M	แคบ
<i>Lactobacillus</i> sp.	
lactocin 27	แคบ
sakacin A	แคบ
sakacin B	แคบ
plantaricin C	กว้าง
<i>Pediococcus</i> sp.	
pediocin A	กว้าง
pediocin PA-1/AcH	กว้าง
<i>Leuconostoc</i> sp.	
leucocin A-UAL 187	กว้าง
<i>Enterococcus</i> sp.	
enterocin A	แคบ
<i>Carnobacterium</i> sp.	
carnocin U149	กว้าง
piscicolin 126	กว้าง
divercin V41	กว้าง

ที่มา: คัดแปลงจาก O'Sullivan *et al.* (2002)

ชลัท (2542) พบ *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* NSC1 ที่แยกนํ้านมดิบผลิตแบคทีเรียโอซินชนิดโนซินที่ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ต่อมาพงษ์เทพ (2546) แยก *Enterococcus faecium* NKR-5-3 จากปลาว่า พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวสามารถลดจำนวน *Clostridium perfringens* ได้

สาโรช (2549) คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคทีริโอซิน และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู โดยนำสารแบคทีริโอซินที่ยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ มาใช้ยับยั้งการเก็บผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู พบว่า *Lactococcus lactis* TISTR 1401 สามารถผลิตสารแบคทีริโอซินยับยั้ง *Bacillus* TISTR 908, *B. cereus* TISTR 687, *B. subtilis* TISTR 008 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ได้

เกริกวุฒิ และ สุชาริณี (2551) แยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้เปิดที่สร้างสารแบคทีริโอซินได้ พบว่ามีแบคทีเรีย 4 ไอโซเลต คือ D4, D8, D9 และ D10 ที่สร้างสารแบคทีริโอซินที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย โดยไอโซเลต D4, D8 และ D9 ยับยั้ง *Enterococcus faecalis* JCM 5803, *Bacillus coagulans* 1447, *Pseudomonas fluorescens* JCM 5693^T และ *P. fluorescens* 358 ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรค จึงสรุปเบื้องต้นว่าไอโซเลต D4, D8, D9 และ D10 สามารถสร้างสารแบคทีริโอซิน และมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก

สุนทรี (2552) แยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคทีริโอซินได้จำนวน 25 ไอโซเลต และ เมื่อนำแบคทีเรียเหล่านั้นมาทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก พบว่ามีเพียงบางไอโซเลต ที่เจริญได้ที่พีเอช 2-10 และไอโซเลตดังกล่าวเจริญในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นสูงถึง 6 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกดังกล่าวเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือน้ำดีเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ และ เกลือน้ำดีเข้มข้น 9 เปอร์เซ็นต์

คมแข และคณะ (2553) แยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีริโอซินจากไส้ปลากะพง พบว่าไอโซเลต Sb2 สร้างสารแบคทีริโอซินที่ยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบหลายชนิด จึงศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเพิ่มเติม ได้แก่ การเจริญและการสร้างแบคทีริโอซินในช่วงพีเอชระหว่าง 3-10 การเจริญในน้ำดีสังเคราะห์ ความเข้มข้น 0.3, 0.6 และ 0.9 เปอร์เซ็นต์ การเจริญในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ และการต้านทานยาปฏิชีวนะ พบว่า ไอโซเลต Sb2 เจริญและสร้างแบคทีริโอซินที่พีเอช 3-10 และมีโซเดียมคลอไรด์ 1-5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 6 แบคทีเรียเจริญและสร้างแบคทีริโอซินได้มากที่สุดถึง 12,800 AU ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ไอโซเลต Sb2 ยังมีคุณสมบัติต้านทานยาปฏิชีวนะ gentamycin, kanamycin, naldixic acid, neomycin, norfloxacin, oxolinic acid และ sulfamethoxazole/trimethoprim ด้วย

Cosby *et al.* (1997) พบว่า *Lactobacillus* ที่แยกจากกระเพาะและไส้ติ่งของไก่ สร้างสารต่อต้านจุลชีพในระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยมีฤทธิ์ยับยั้ง *Salmonella Typhimurium* ได้

นอกจากนี้ Franz *et al.* (1998) พบว่า *Lactobacillus plantarum* BFE905 ผลิตแบคทีเรียโอซิน ชื่อ plantaricin D ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง *Listeria monocytogenes* และ มีความคงตัวที่พีเอชช่วง 2-10 การใช้แบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดอินทรีย์และสารยับยั้งแบคทีเรียอื่น ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย พบว่า การใช้ pediocin 600 AU ร่วมกับโซเดียมไดอะซีเตต และ โซเดียมแลคเตต ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยลดจำนวนการปนเปื้อน *Listeria monocytogenes* ในเนื้อวัวที่เก็บแบบสุญญากาศ ที่ 4 องศาเซลเซียส ในขณะที่การใช้โซเดียมไดอะซีเตต และ โซเดียมแลคเตตเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งที่ระยะเวลาเท่ากัน ลดจำนวนเชื้อลงเหลือ 1.5 และ 2.5 log CFU ต่อกรัม ตามลำดับ (Uhart *et al.*, 2004)

Bari *et al.* (2005) รายงานการใช้โนซิน และ pediocin ร่วมกับกรดซิตริกโพแทสเซียมซอร์เบต และกรดไฟติกในการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* และพบว่าการใช้โนซินร่วมกับกรดไฟติกให้ประสิทธิภาพในการลดจำนวน *L. monocytogenes* คีที่สุด

Nieto-Lozano *et al.* (2006) ศึกษาผลของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Pediococcus acidilactici* ที่ยับยั้ง *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium perfringens* ในเนื้อดิบสเปน พบว่าเมื่อนำตัวอย่างเนื้อดิบ แบคทีเรียโอซิน และเชื้อทดสอบมาบ่มรวมกัน สามารถลดปริมาณของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* และ *C. perfringens*

Todorov and Dicks (2006) แยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีเรียโอซินจากมะละกอ พบ *Lactobacillus plantarum* ST16P ที่สร้างแบคทีเรียโอซินขนาด 6.5 kDa และ มีฤทธิ์ยับยั้ง *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* และ *Listeria* spp. และ กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินมีความคงตัว แม้มันที่พีเอช 2 และ 12 หรือที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

Sriornual *et al.* (2007) แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ปลาสดในประเทศไทย พบว่า *Weissella cibaria* 110 ผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีขนาด 2.5 kDa และ ไม่เหมือนกับแบคทีเรียโอซินอื่น ๆ ที่รู้จักก่อนหน้านี้ จึงจำกัดความให้เป็นแบคทีเรียโอซินชนิดใหม่ และเรียกชื่อเป็น weissellicin 110

Chavasirikunton *et al.* (2007) พบว่า *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ CP 2-11 และ CP 1-15 ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกเปรี้ยวในประเทศไทย ยับยั้งการเจริญของ *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ได้

Gong *et al.* (2010) พบว่า *Lactobacillus plantarum* KLD 0391 ซึ่งแยกจาก Jiaoke ครีมหักพื้นบ้านของประเทศจีน สามารถผลิต plantaricin MG ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* และ *B. subtilis*) และ แกรมลบ (enteropathogenic *Escherichia coli*, enterotoxigenic *E. coli*, enteroinvasive *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* และ *Salmonella* Typhimurium)

Nieto-Lozano *et al.* (2010) พบว่า pediocin PA-1 ซึ่งผลิตโดย *Pediococcus acidilactici* MCH14 ยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium perfringens* ในไส้กรอกหมักแห้งและไส้กรอกสเปน โดยเมื่อใช้ pediocin PA-1 ความเข้มข้น 5,000 แบคทีเรียโอซินยูนิตต่อมิลลิลิตร (BU/ml) สามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* และ *C. perfringens* ได้ 2 log cycle เทียบกับชุดควบคุม เมื่อบ่มที่ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วัน

Wan Norhana *et al.* (2012) พบว่าการใช้ไนซิน, EDTA และ เกลือของกรดอินทรีย์ (โพแทสเซียมโซเบท, โซเดียมเบนโซเอท หรือ โซเดียมไดอะซิเตท) ร่วมกัน มีผลยับยั้ง *Listeria monocytogenes* และ *Salmonella* Typhimurium ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์กุ้งแช่แข็งได้

Ravi Sankar *et al.* (2012) แยกแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ผลิตแบคทีเรียโอซินจากน้ำนมวัว พบว่า *Lactobacillus plantarum* ผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีขนาด 9.5 kDa และสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหาร มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส และคงตัวที่พีเอชช่วง 3-11

Martinez *et al.* (2013) แยก *Lactobacillus plantarum* ST71KS ซึ่งสร้างแบคทีเรียโอซิน ST71KS ได้จากเนยแข็งทำจากนมแพะ โดยเป็นแบคทีเรียโอซินขนาด 5.0 kDa สามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes* สายพันธุ์ 603 และ 607 ได้ แบคทีเรียโอซิน ST71KS มีคุณสมบัติเหมือนกับ plantaricin S และ pediocin PA-1

การแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

สุพรรณิการ์ (2547) แยกได้แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 253 ไอโซเลต จากข้าวหมักเพื่อเตรียมแป้งขนมจีน เมื่อจัดจำแนกพบว่าแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* โดยพบว่า *Enterococcus* และ *Streptococcus* สามารถย่อยแป้งได้ดี ในขณะที่สกุล *Lactobacillus* ผลิตกรดได้ดี

ปิยะมาศ (2547) แยก Bifidobacteria ได้ทั้งสิ้น 167 ไอโซเลต จากอุจจาระเด็กทารก จำนวน 20 ตัวอย่าง และเมื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกในมนุษย์ พบแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติก พบว่าไอโซเลต SU1026 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในรองลงมา คือ BK1 และ SB113 ตามลำดับ โดยเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ น้ำดีเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ไวต่อยาปฏิชีวนะ ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *Bacillus cereus*, *B. coagulans* และ *Echerichia coli* และทนต่อน้ำย่อยเทียมของลำไส้เล็กได้ เมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA พบว่าไอโซเลต SU1026 และ BK1 ใกล้เคียงกับ *Bifidobacterium animalis* ส่วนไอโซเลต SB113 ใกล้เคียงกับ *B. bifidum* โดยมีค่าความเหมือน 98 เปอร์เซ็นต์

จุฑาทิพย์ และ วิเชียร (2548) คัดเลือกและจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกจากนํ้านมข้าวเพื่อผลิตโยเกิร์ต โดยคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากนํ้านมข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปบ่ม 37 องศาเซลเซียส พบว่าได้แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดรูปร่างกลม และท่อนรวม 88 ไอโซเลต เมื่อนำมาจัดจำแนกพบว่า เป็น *Lactobacillus plantarum* KUS1, *Pediococcus pentosaceus* KUR1 และ *P. pentosaceus* KUR2 ซึ่งเหมาะจะนำมาใช้เป็นก๊อแล้เชื้อในการผลิตโยเกิร์ตจากนํ้านมข้าวด้วย

ภัทรวดี (2549) คัดเลือกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้เล็กสุกรเพื่อพัฒนาเป็นโปรไบโอติกสำหรับสุกร คัดเลือกได้แบคทีเรีย 10 ไอโซเลต ที่มีโคโลนีสีเหลือง เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง MRS และสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติกออกมาอย่างค่อยๆเคลือบคาร์บอนेटที่เป็นส่วนผสมของอาหาร MRS เกิดเป็นบริเวณใส ซึ่งเป็นลักษณะที่พบทั่วไปในเชื้อกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก จากนั้นศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 10 ไอโซเลต มีรูปร่างท่อนยาว เรียงต่อกันเป็นสาย ไม่เคลื่อนที่และไม่สร้างสปอร์ ดิจีสแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลส และ ไม่สร้างแก๊ส จึงจัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Homofermentative bacteria จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกไปจัดจำแนก โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CH ที่ใช้ร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งปรากฏว่าทั้ง 10 ไอโซเลตเป็น *Lactobacillus acidophilus*

ปรีชา (2550) แยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีเรียโอซินจากระบบทางเดินอาหารของปลาชุกชุมจำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่าแยกได้แบคทีเรียที่มีคุณลักษณะเฉพาะตรงกับแบคทีเรียกรดแลคติก คือ เซลล์ดิจีสแกรมบวก และ ไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลส จำนวน 102 ไอโซเลต

ปรีชา (2550) แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ไก่และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกได้จำนวน 194 ไอโซเลต เมื่อศึกษาการทนน้ำดีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และการผลิตสารยับยั้งเชื้อก่อโรคที่พบในไก่ พบแบคทีเรีย 11 ไอโซเลต ที่ผลิตสารยับยั้ง *Campylobacter jejuni* ATCC 33291, *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella* Enteritidis DMST 17368, *S. Typhimurium*, *Shigella dysenteriae* และ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในไก่ เมื่อจัดจำแนกแบคทีเรียเหล่านี้พบว่า เป็น *Lactobacillus salivarius*, *L. fermentum*, *L. reuteri* และ *Lactobacillus* sp.

บัวสาย (2553) แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลสุกร 136 ตัวอย่าง พบแบคทีเรียกรดแลคติก 137 ไอโซเลต เมื่อทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค 8 สายพันธุ์ โดยวิธี agar well diffusion พบว่าการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคส่วนใหญ่เกิดจากฤทธิ์ของกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้น ยกเว้น ไอโซเลต WX153 ที่สามารถสร้างสารยับยั้งคล้ายแบคทีเรียโอซิน เมื่อจัดจำแนกโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHI และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าไอโซเลต WX153 เป็นแบคทีเรีย *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* โดยพบว่าจะผลิตสารยับยั้งไปพร้อม ๆ กับการเจริญในอาหาร MRS ผลจากงานวิจัยนี้คัดเลือกได้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และมีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในสุกร นอกจากนี้สาร

ยับยั้งที่ผลิตโดย *L. lactis* subsp. *lactis* WX153 อาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียชีวภาพในอุตสาหกรรมอาหารได้

ไพรัตน์ และ วิชัย (2553) ศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้น และ ความไวต่อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรีย *Lactobacillus* ที่แยกได้จากมูลไก่พื้นเมือง จากนั้นนำแบคทีเรีย *Lactobacillus* ที่แยกได้ทั้ง 65 ไอโซเลต มาทดสอบความทนกรดและเกลือแร่ และ ความไวต่อยาต้านจุลชีพ 11 ชนิด โดยใช้วิธี disc diffusion แล้วนำแบคทีเรีย *Lactobacillus* ที่คัดเลือกได้ว่าทนกรดและเกลือแร่มาจัดจำแนกเพื่อระบุสกุลและสปีชีส์ของเชื้อด้วยวิธี pulsedfieldgel electrophoresis (PFGE) และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ตามลำดับพบว่า มีแบคทีเรีย *Lactobacillus* จำนวน 11 ไอโซเลตที่ทนกรดและเกลือแร่ และพบว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus* 6 ไอโซเลตที่มีความไวมากต่อยาต้านจุลชีพ penicillin, tetracycline และ chloramphenicol และมีความไวปานกลางต่อยาต้านจุลชีพ bacitracin, erythromycin และ nitrofurantoin เมื่ออาศัยคุณสมบัติการทนกรด การทนเกลือแร่ จึงคัดเลือกแบคทีเรีย *Lactobacillus* ได้เพียง 6 ไอโซเลต และจัดจำแนกได้เป็น *L. salivarius* โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ 99-100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank (accession number CP000233.1)

Shewmaker *et al.* (2004) แยกแบคทีเรียกรดแลคติก *Vagococcus carniphilus* จากเนื้อวัว และเนยแข็งสีแดง (Mayr *et al.*, 2004) ซึ่งไม่มีรายงานการก่อโรค แต่ยับยั้งการเจริญ *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* และ *Hafnia alvei*

Lin *et al.* (2007) แยกแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus fermentum* จากระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีกและสุกร พบว่าแบคทีเรียที่ได้จากระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีกมีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกได้ดีกว่าแบคทีเรียที่ได้จากสุกร

Ponce *et al.* (2008) แยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารคล้ายแบคทีเรียโอซินจากใบผักออร์แกนิก พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติก 4 สายพันธุ์ คือ *Enterococcus faecium*, *E. hirae*, *E. canis* และ *Lactococcus lactis* ผลิตสารคล้ายแบคทีเรียโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Listeria monocytogenes* และ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

Matamoros *et al.* (2009) แยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญได้ในที่เย็น และยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ เพื่อใช้สารที่เชื้อผลิตเป็นสารกันเสียชีวภาพสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารทะเล พบว่าแยกได้แบคทีเรีย 5,575 โคลน จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักต่าง ๆ แต่มีเพียง 52 ไอโซเลต ที่เจริญได้ในที่เย็น และยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ และพบว่ามีเพียง 7 ไอโซเลต ที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุด เมื่อนำมาจัดจำแนกโดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ปรากฏว่าเป็น *Leuconostoc gelidum* จำนวน 3 ไอโซเลต *Lactococcus piscium* จำนวน 2 ไอโซเลต *Lactobacillus fuchuensis* จำนวน 1 ไอโซเลต และ *Carnobacterium alterfunditum* จำนวน 2 ไอโซเลต และไม่มีสายพันธุ์ใดสร้างสาร histamine และ tyramine ซึ่งเป็นสารก่อภูมิแพ้ (Taylor, 1986) จึงสามารถนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปใช้เป็นสารกันเสียชีวภาพสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารทะเลได้

Irisawa and Okada (2009) แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำเลี้ยงต้น โอ๊ค (*Quercus* sp.) ที่อยู่บนเกาะ Awashima ในประเทศญี่ปุ่น พบแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ จำนวน 3 ไอโซเลต คือ NRIC 0736^T, NRIC 0735 และ NRIC 0737 เมื่อศึกษาระดับพันธุกรรม พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลต มีค่าความเหมือนที่ใกล้เคียงกันมาก คือ มากกว่า 99.7 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเหมือนกับ *Lactobacillus satsumensis* NRIC 0604^T เป็น 96.3 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความเหมือนกับ *Lactobacillus mali* DSM 20444^T เป็น 95.3 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าความเหมือนกับ *Lactobacillus vini* DSM 20605^T เป็น 95.3 เปอร์เซ็นต์ แต่ทั้ง 3 ไอโซเลต แสดงค่าความเหมือนที่ต่ำ (<97 เปอร์เซ็นต์) เกินกว่าที่จะทราบว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก จึงต้องศึกษาความสัมพันธ์ โดยวิธี DNA-DNA hybridization ทำให้ทราบว่าทั้ง 3 ไอโซเลตเป็นสปีชีส์เดียวกัน และเป็นสปีชีส์ใหม่ จึงตั้งชื่อเป็น *Lactobacillus sucicola* และมี type strain เป็น NRIC 0736^T

Kirtzalidou *et al.* (2011) คัดแยก lactobacilli ที่เป็นโปรไบโอติกจากอุจจาระของทารกได้ 74 ไอโซเลต จากตัวอย่างทั้งหมด 63 ตัวอย่าง จากนั้นทดสอบการทนต่อกรดและน้ำดี ความสามารถในการยึดเกาะเซลล์เยื่อในลำไส้ ความไวต่อยาปฏิชีวนะและกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลต คือ *Lactobacillus salivarius* C3 และ *L. rhamnosus* C44 ที่ความสามารถเป็นโปรไบโอติกได้ โดยพิจารณาจากคุณสมบัติต่าง ๆ ที่ใช้คัดเลือก

Lee *et al.* (2012) แยกแบคทีเรียกรดแลคติก *Weissella* ที่มีคุณสมบัติเป็น โปรไบโอติกจากอุจจาระของมนุษย์ พบ *Weissella confusa* จำนวน 3 ไอโซเลต และ *Weissella cibaria* จำนวน 5 ไอโซเลต ที่ทนพีเอชต่ำ คือ พีเอช 2 และ 3 ทนต่อเกลือ น้ำดีเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถยึดเกาะกับเซลล์เยื่อในผนังลำไส้ได้ดี

ความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

มีการนำแบคทีเรียกรดแลคติกไปใช้ประโยชน์มากมายในอุตสาหกรรมอาหาร ทั้งอาหารคนและสัตว์ ทั้งในแง่ของการใช้เป็นสารกันเสียชีวภาพ เป็นโปรไบโอติก ซึ่งคุณสมบัติหนึ่งที่จะคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกไปใช้ประโยชน์ คือ ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค จึงมีการศึกษาและรายงานมากมายเกี่ยวกับความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

Price and Lee (1970) แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารทะเล และจำแนกได้ว่าเป็น *Lactobacillus plantarum* ที่ผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. และ *Proteus* spp. ซึ่งสารดังกล่าวไม่ทนความร้อน และถูกยับยั้งโดยเอนไซม์อะมัยเลส จึงเข้าใจว่าสารนั้น คือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และต่อมาในปี 1973 Singh and Laxminarayana รายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. lactis* และ *L. plantarum* ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โคลิฟอร์ม *Staphylococcus* และ *Escherichia coli* ที่ก่อให้เกิดโรคได้

Ammor et al. (2006) พบว่า *Vagococcus carniphilus* ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Lactobacillus sakei*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus carnosus*, *S. aureus* และ *Listeria innocua* ได้ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

Grimoud et al. (2010) คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ต้านการเจริญของเชื้อก่อโรค พบว่ามีเพียง *Bifidobacterium breve* และ *B. bifidum* ที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ และ *Lactobacillus farciminis* ยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมลบ และแกรมบวก และ *Streptococcus thermophilus* ยับยั้ง *Escherichia coli* O157:H7 ได้

Svetoch et al. (2011) แยกแบคทีเรีย *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) จากลำไส้สัตว์ปีก โดยพบว่าสร้างสารแบคทีริโอซิน และยับยั้ง *Campylobacter jejuni* และ *Salmonella Enteritidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ได้

ความสามารถย่อยไฟเตตของแบคทีเรียกรดแลคติก

ไฟเตตเป็นสารประกอบของฟอสฟอรัส ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในเมล็ดธัญพืช เมล็ดพืช ที่ให้น้ำมันและพืชตระกูลถั่วต่าง ๆ (Konietzny and Greiner, 2002) ซึ่งไฟเตตมีผลในการยับยั้งการ ดูดซึมแร่ธาตุปริมาณน้อยที่จำเป็นต่อร่างกายมนุษย์ และ สัตว์ เช่น Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} และ Fe^{2+}/Fe^{3+} (Harland and Narula 1999) เป็นต้น จึงทำให้แร่ธาตุเหล่านี้เกิดเป็นสารประกอบของเกลือ ที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งสัตว์กระเพาะเดี่ยว เช่น หมู สัตว์ปีก ปลา รวมถึงมนุษย์ ไม่มีเอนไซม์ในระบบ ทางเดินอาหารที่จะย่อยสารประกอบเชิงซ้อนของไฟเตต ทำให้สัตว์ไม่สามารถดูดซึมแร่ธาตุต่าง ๆ รวมถึงไม่สามารถใช้ประโยชน์ฟอสฟอรัสได้ (Greiner and Konietzny, 1996) ในอุตสาหกรรม อาหารสัตว์จำเป็นต้องใช้เมล็ดธัญพืช และพืชตระกูลถั่วต่าง ๆ เป็นวัตถุดิบพื้นฐานในการผลิต หาก แบคทีเรียกรดแลคติกที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคในสัตว์ได้นั้น มีกิจกรรมการย่อยไฟเตตได้ด้วย ก็จะช่วยให้ สัตว์ดูดซึมสารอาหารได้ดียิ่งขึ้น มีรายงาน พบว่า *Lactobacillus plantarum* ซึ่งคัดเลือกมาจากผัก หมักตามธรรมชาติ มีกิจกรรมการย่อยไฟเตต แต่กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสต่ำมาก (Zamudio *et al.*, 2001)

De Angelis *et al.* (2003) คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างเอนไซม์ไฟเตสชนิดเก็บไว้ใน เซลล์ (intracellular enzyme) พบว่า *Lactobacillus alimentarius* 5Q, *L. sanfranciscensis* CB1, *L. brevis* 14G, *L. fermentum* 6E, *L. acidophilus* 16A, *L. plantarum* DC400, *L. farciminis* I2, *L. hilgardii* 52B, *L. fructivorans* DA106, *Leuconostoc citreum* 23B, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 11M และ *Weissella confusa* 14A สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้ และ *L. sanfranciscensis* CB1 มี กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด คือ 420.8 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Haros *et al.* (2005) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสเป็นเมแทบอลิซึมใหม่ที่พบใน แบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Bifidobacterium* นอกจากนี้ *Bifidobacterium dentium*, *L. reuteri* และ *L. salivarius* มีกิจกรรมย่อยไฟเตตสูง (María *et al.*, 2008) Haros *et al.* (2007) พบว่า bifidobacterial 5 สปีชีส์ คือ *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum* และ *B. pseudolongum* ซึ่งแยกจาก ลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ มีกิจกรรมย่อยไฟเตต และแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ย่อยไฟเตตได้จาก ไล่ไก่ นอกจากนี้พบว่า *Pediococcus pentosaceus* สามารถย่อยไฟเตต และยังมีคุณลักษณะอื่น ๆ ที่เป็น โปรไบโอติกอีกด้วย (Raghavendra and Halami, 2009)

โปรไบโอติก

โปรไบโอติกเป็นคำที่มีรากศัพท์มาจากภาษากรีก-ลาติน หมายถึง เพื่อชีวิต เริ่มมีการนำเอาคำว่าโปรไบโอติกมาใช้เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1955 แต่ขณะนั้นยังไม่มีกรให้คำจำกัดความของโปรไบโอติกไว้อย่างชัดเจน

Lilly and Stillwell (1965) ให้คำจำกัดความของโปรไบโอติกเป็นครั้งแรกว่า โปรไบโอติกคือ สารที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง และสารนั้นสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ จากนั้นมีผู้ให้ความหมายและคำจำกัดความของโปรไบโอติกไว้อีกมากมาย

คำจำกัดความของโปรไบโอติกที่ถูกนำมาใช้มากที่สุดเป็นของ Fuller (1989) ซึ่งให้คำจำกัดความไว้ว่า โปรไบโอติก คือ อาหารเสริมที่เป็นจุลินทรีย์มีชีวิต ส่งผลให้เกิดประโยชน์ต่อสัตว์ที่จุลินทรีย์นั้นเข้าไปอาศัยอยู่ โดยอาหารเสริมช่วยเพิ่มความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในทางเดินอาหารของสัตว์และจำกัดความว่า ลักษณะของโปรไบโอติกที่ดีควรมีลักษณะดังนี้

1. ควรเป็นสายพันธุ์ที่ส่งผลให้เกิดประโยชน์ต่อสัตว์ เช่น ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโต ช่วยต้านทานโรค เป็นต้น
2. ควรเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคและไม่สร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อโฮสต์
3. เป็นเซลล์ปกติที่สามารถเพิ่มจำนวนได้
4. สามารถรอดชีวิตและมีเมแทบอลิซึมในสภาวะแวดล้อมลำไส้ เช่น ทนต่อพีเอชต่ำ กรดอินทรีย์ และ น้ำดี เป็นต้น

Havenaar *et al.* (1992) ได้เพิ่มเติมคำจำกัดความของ Fuller (1989) ว่า อาจใช้โปรไบโอติกในรูปของอาหารและไม่ใช่อาหารได้ โดยอาจผลิตโปรไบโอติกจากจุลินทรีย์บริสุทธิ์สายพันธุ์เดียวหรือหลายสายพันธุ์ผสมกัน

กลุ่มผู้เชี่ยวชาญโปรไบโอติกในยุโรปได้เสนอให้เพิ่มเติมคำจำกัดความของโปรไบโอติกจาก Fuller (1989) ว่า โปรไบโอติกก่อให้เกิดกลไกการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ในร่างกาย นอกเหนือจากกลไกที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ประจำถิ่นในร่างกาย

Holzapfel *et al.* (2001) เสนอคำจำกัดความที่ใช้กันโดยทั่วไป คือ จุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิต สามารถส่งเสริมหรือสนับสนุนความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารเพิ่มมากขึ้น

ปี 2001 องค์การอนามัยโลกได้ให้คำจำกัดความ โปรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อได้รับในปริมาณที่เหมาะสม จะเป็นผลดีต่อสุขภาพของโฮสต์ ซึ่งเป็นคำจำกัดความที่มีการนำไปใช้อ้างอิงมากที่สุดในปัจจุบัน

คมแข และคณะ (2553) ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lactobacillus salivarius* K4 ที่แยกจากลำไส้ไก่ พบว่าสารยับยั้งที่สร้างจาก *L. salivarius* K4 สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ *L. salivarius* K4 เจริญได้ที่ค่าพีเอช 3-3.5 เจริญได้ในน้ำที่มีความเข้มข้นสูงถึง 12 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าน้ำดีไก่สดความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มีผลให้เชื้อลดจำนวนลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และเมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยจำลองที่พีเอช 3, 4 และ 7 เชื้อสามารถรอดชีวิตผ่านกระเพาะจำลองไปถึงลำไส้จำลองได้ นอกจากนี้ *L. salivarius* K4 ยังต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ gentamycin, kanamycin, nalidixic acid, neomycin, norfloxacin, oxolinic acid, tetracyclin, oxytetracyclin และ streptomycin

การนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาใช้เป็นโปรไบโอติก

การเสริมโปรไบโอติกที่มีคุณลักษณะดี มีวัตถุประสงค์เพื่อลดแบคทีเรียก่อโรคนำไส้ของโฮสต์ จึงมีรายงานเกี่ยวกับการทดสอบใช้โปรไบโอติกในโฮสต์โดยตรง La ragione *et al.* (2004) พบว่าการใช้แบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus johnsonii* F19185 เป็นโปรไบโอติกในไก่ ช่วยลดจำนวนของแบคทีเรียก่อโรค *Escherichia coli* O78K80 และ *Clostridium perfringens* และแบคทีเรียกรดแลคติก *Bifidobacterium thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *L. acidophilus* และ *L. casei* ช่วยลดจำนวน *Campylobacter jejuni* ในลำไส้ไก่ได้ (Willis and Reid, 2008) Vila *et al.* (2009) รายงานว่าการเกาะกลุ่ม และบุกรุกของ *Salmonella* Enteritidis ในไก่ลดลง เมื่อเติมสปอร์ของโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Bacillus cereus* var. *toyoi* อย่างต่อเนื่อง

Angelis *et al.* (2007) ศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* 4.1 และ *L. reuteri* 3S7 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก โดยการผสมแบคทีเรียทั้งสองลงไปในการสุกร โดยที่มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิต 10^{10} เซลล์ต่อวัน พบการรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้งสองในระบบทางเดินอาหาร และเมื่อนับจำนวนเซลล์ในมูลสุกรมี *L. plantarum* 4.1 และ *L. reuteri* 3S7 รอดชีวิต

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์

แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Enteritidis* DMST 15676, *Samonella Typhimurium* ATCC 13311 และ *Clostridium perfringens* ATCC 13124

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- 2.1 อาหารแข็ง DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS)
- 2.2 อาหารเหลว DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS)
- 2.3 อาหารแข็ง Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC)
- 2.4 อาหารเหลว Thioglycolate
- 2.5 อาหารเหลว TSB
- 2.6 Tryptone Soy Agar (TSA) ที่เติม yeast extract 0.6 เปอร์เซ็นต์
- 2.7 อาหารเหลว MRS-MOPs
- 2.8 อาหารแข็ง MRS-MOPs

3. สารเคมี

- 3.1 แอลกอฮอล์
- 3.2 Gas Pack
- 3.3 แคลเซียมคาร์บอเนต
- 3.4 กลีเซอรอล
- 3.5 เพปโทน
- 3.6 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
- 3.7 สารละลาย D-cycloserine

4. อุปกรณ์อื่น ๆ

- 4.1 หลอดพลาสติก สำหรับใช้กับเครื่องปั่นเหวี่ยง
- 4.2 เครื่องดูจ่ายสารอัตโนมัติขนาดต่าง ๆ
- 4.3 เครื่องผสมสาร
- 4.4 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง
- 4.5 Anaerobic jar
- 4.6 โถบ่มเชื้อ (Candle jar)
- 4.7 ตู้เขี่ยเชื้อ
- 4.8 ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส
- 4.9 ตู้อบ 180 องศาเซลเซียส
- 4.10 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
- 4.11 เครื่องปั่นเหวี่ยง
- 4.12 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
- 4.13 กล้องจุลทรรศน์

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างและแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งตัวอย่าง

1.1 เก็บตัวอย่างที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น ยอดไม้ ดอกไม้ ใส้ปลา ใส้ไก่ มูลไก่ และอาหารหมัก ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique)

1.2 ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส้ในสารละลายเพปโทนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าให้แบคทีเรียกรดแลคติกที่เกาะอยู่กับตัวอย่างหลุดออกมาโดยใช้เครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที สำหรับตัวอย่างประเภทของเหลว ไม่ต้องทำขั้นตอน 1.2 แต่นำมาแยกเชื้อในขั้นตอน 1.3 และ 1.4

1.3 เจือจางตัวอย่างแบบลำดับส่วนครั้งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมต่อการนับจำนวนของแบคทีเรีย จากนั้นเกลี่ยตัวอย่างลงบนอาหารแข็ง MRS (deMan-Rogosa-Sharpe) ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) ให้มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) ด้วยวิธี spread plate บ่มเชื้อทั้งหมดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย โดยใช้โถบ่มเชื้อที่จุดเทียน (candle jar) แล้วปิดฝาโถ ซึ่งเทียนจะดับลง จึงมีออกซิเจนเหลือเพียงเล็กน้อย เลือกลูกโคโลนีเดี่ยวที่มีบริเวณใสรอบโคโลนี ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียกรดแลคติกสร้างกรดมาย่อยแคลเซียมคาร์บอเนตจึงเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

1.4 นำแบคทีเรียที่แยกได้ไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้ง โดยวิธี streak บนอาหารแข็ง MRS ที่เติม CaCO_3 ให้มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) บ่มจนเพาะเชื้อใน candle jar และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้ว นำมาย้อมสีแบบแกรม ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทดสอบการสร้างเอนไซม์อะเลส (ภาคผนวก ก) แล้วเลือกไอโซเลตที่ติดสีแกรมบวก และไม่สร้างเอนไซม์อะเลส เก็บไว้ในกลีเซอรอลเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นตอนต่อไป

1.5 สำหรับดอกไม้และยอดไม้ อาจเป็นแหล่งตัวอย่างที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่น้อย จึงจำเป็นต้องเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อนที่จะแยกเชื้อ ซึ่งการเพิ่มจำนวนเชื้อทำโดยนำตัวอย่างมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มใน candle jar และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเขี่ยบนอาหารแข็ง MRS ที่เติม CaCO_3 ให้มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อ

ทั้งหมดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน candle jar เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีบริเวณใสรอบโคโลนี แล้วทำเช่นเดียวกับขั้นตอน 1.4

2. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก

2.1 การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์กับแบคทีเรียก่อโรค

2.1.1 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลคติก

2.1.1.1 เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS บ่มใน candle jar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกโคโลนีเดี่ยว มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.1.1.2 เมื่อครบเวลา นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์มาเตรียมเซลล์แขวนลอย

2.1.1.3 ปรับปริมาณเซลล์แขวนลอยให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์ประมาณ $1 \times 10^8 - 2 \times 10^8$ CFU ต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์

2.1.2 การเตรียมแบคทีเรียก่อโรค

2.1.2.1 นำแบคทีเรียก่อโรค คือ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Enteritidis DMST 15676 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง TSA (ภาคผนวก ก) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว TSB (ภาคผนวก ก) บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ส่วน *Clostridium perfringens* ATCC 13124 นั้น เลี้ยงบนอาหารแข็ง TSC ที่ไม่เติม cycloserine (ภาคผนวก ก) และเททับด้วยอาหารแข็ง TSC ที่ไม่เติม cycloserine (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส รอจนอาหารแข็งแล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยใช้ anaerobic jar ที่มี GasPak (Merck, Germany) ทำให้เกิด

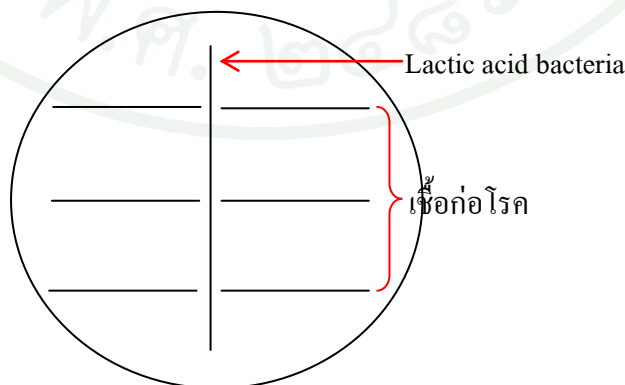
สภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกลงโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว Thioglycolate (ภาคผนวก ก) บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.1.2.2 แยกแบคทีเรียก่อโรคออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการปั่นเหวี่ยง และทำตามขั้นตอน 2.1.1.2 และ 2.1.1.3 เช่นเดียวกับแบคทีเรียกรดแลคติก

2.1.3 การทดสอบความเป็นปฏิกิริยากับแบคทีเรียก่อโรค

2.1.3.1 ใช้ไม้ปั่นสำลิจุ่มเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ปรับมีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 ลากลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAYE (ภาคผนวก ก) บ่มจนเพาะเชื้อทั้งหมดใน candle jar บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำแบคทีเรีย *S. Enteritidis* DMST 15676, *E. coli* ATCC 25922 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 เตรียมแขวนลอยให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 มาลากในแนวตั้งฉากกับแนวแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม โดยให้มีระยะห่างกันประมาณ 1-2 มิลลิเมตร (ดังภาพที่ 3) จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.1.3.2 สำหรับการทดสอบความเป็นปฏิกิริยากับแบคทีเรีย *C. perfringens* ATCC 13124 ทำโดยนำ *C. perfringens* ATCC 13124 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยใช้ anaerobic jar เตรียมแขวนลอยให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 แล้วนำมาลากในแนวตั้งฉากกับแนวแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมให้ห่างกันประมาณ 1-2 มิลลิเมตร บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน ใน anaerobic jar ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 3 การทดสอบความเป็นปฏิกิริยากับแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติก

2.1.3.3 หากแบคทีเรียกรดแลคติก สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ จะพบบริเวณยับยั้งตรงแนวที่เชื้อทั้งสองตั้งฉากกัน และวัดบริเวณยับยั้งจากจุดกึ่งกลางเส้นการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกถึงบริเวณที่มีแบคทีเรียก่อโรคเจริญ

2.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไฟเตส

2.2.1 เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง MRS-MOPS (ภาคผนวก ก) บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเพาะเชื้อต่ออีก 1 รอบ ก่อนนำไปทดสอบสร้างเอนไซม์ไฟเตส เพื่อเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียสร้างเอนไซม์

2.2.2 เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์

2.2.3 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที อีกครั้ง จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์มาเตรียมเซลล์แขวนลอยให้มีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.1 เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

2.2.4 เพาะกล้าเชื้อบนอาหารแข็งสูตรดัดแปลง MRS-MOPS (ภาคผนวก ก) ด้วยวิธี drop inoculation โดยหยดเซลล์แขวนลอยปริมาตร 3 ไมโครลิตร บนผิวหน้าอาหารแข็ง MRS-MOPS บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ไฟเตสจะพบวงใสรอบโคโลนี

2.2.5 รายงานผลการสร้างเอนไซม์ไฟเตสเป็นค่าส่วนต่างระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นกับเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี

2.3 การศึกษาการสร้างเอนไซม์ไฟเตสในอาหารเหลว

2.3.1 เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง MRS-MOPS (ภาคผนวก ก) บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3.2 เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง และเตรียมเซลล์แขวนลอยด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นก้ำเชื้อ

2.3.3 นำก้ำเชื้อจากข้อ 2.3.2 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลง MRS-MOPS (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ปรับให้มีค่า OD₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3.4 เก็บน้ำเลี้ยงเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส (ภาคผนวก ก)

3. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติก

3.1 การทนอุณหภูมิ

3.1.1 เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก) บ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเพาะในอาหารเหลว MRS บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.1.2 เมื่อครบเวลา นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์มาเตรียมเซลล์แขวนลอย เพื่อใช้เป็นก้ำเชื้อ

3.1.3 เพาะก้ำเชื้อลงในอาหารเหลว MRS โดยปรับให้มีค่า OD₆₀₀ เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 จากนั้นไปบ่มที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.1.4 วัดค่าการเจริญของแบคทีเรียในรูปค่า OD₆₀₀ ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

3.2 การทนกรด (Jacobsen *et al.*, 1999)

3.2.1 เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก) บ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก) บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.2.2 เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนมาเตรียมเซลล์แขวนลอย

3.2.3 ปรับค่า OD₆₀₀ เริ่มต้นของเซลล์แขวนลอย ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 ด้วยอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก) เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

3.2.4 นำกล้าเชื้อ 1.25 มิลลิลิตร มาเพาะลงในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่ปรับพีเอชเป็น 2, 2.5, 3.0, 3.5 และ 6.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์

3.2.5 บ่มตัวอย่างบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างทุกชั่วโมง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เพื่อตรวจการรอดชีวิตบนอาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก) ด้วยวิธี spread plate

3.3 การทนเกลือที่ดี (Gilliland *et al.*, 1984)

3.3.1 เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก) บ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเพาะเชื้อในอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก) บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.3.2 เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนเซลล์มาเตรียมเซลล์แขวนลอย ให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 ด้วยอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก) เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ

3.4.4 นำกลี้อเชื้อปริมาณ 1.25 มิลลิลิตร ใส่ในพลาสติก ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติมเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์

3.5.5 บ่มตัวอย่างทั้งหมดบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างทุกชั่วโมง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง แล้วนำมา spread บนอาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก) เพื่อศึกษาการรอดชีวิต

4. การจัดจำแนกและระบุชื่อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์ โดยการสังเกตลักษณะโคโลนีบน จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง การย้อมสีเซลล์แบบแกรม และการสังเกตลักษณะเซลล์และการ จัดเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รวมทั้งการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น คือ การทดสอบการสร้าง เอนไซม์คะตะเลส (catalase test) (ภาคผนวก ข)

4.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียโดยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

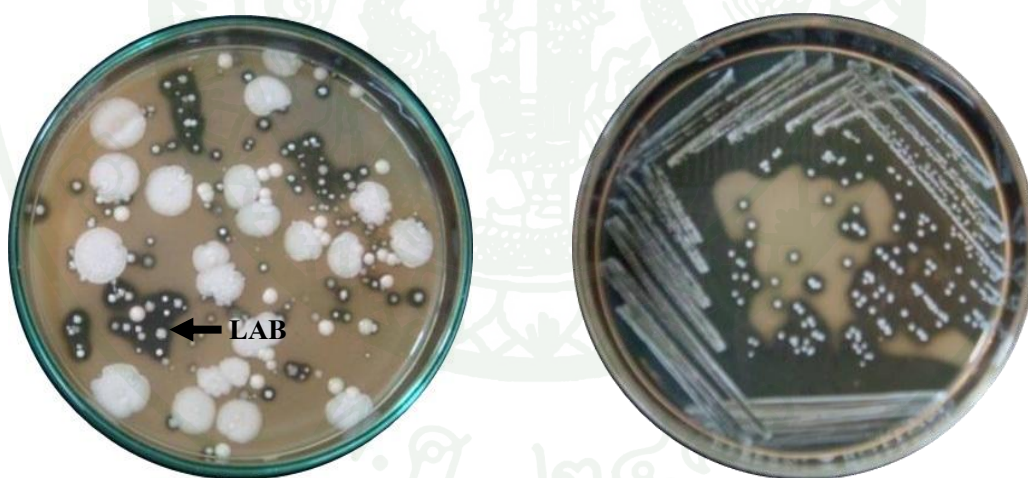
การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล ทำโดยการหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ต้องการจัดจำแนกและเปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียจากฐานข้อมูล เริ่มจากนำแบคทีเรียกรดแลคติก ที่คัดเลือกมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มจำนวนของ 16S rDNA โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่ (polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งใช้คู่ไพรเมอร์ คือ 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3') เป็น forward primer และ 1389R (5'-ACGGGCGGTGTGTACAAG-3') เป็น reverse primer (Lane, 1991) จากนั้นทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid, Taiwan) แล้วส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ 16S rDNA โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่บริษัท 1st BASE ประเทศมาเลเซีย แล้วนำลำดับนิวคลีโอ ไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 16S rDNA ของแบคทีเรียจากฐานข้อมูล Eztaxon -e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

ผลและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างและแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งตัวอย่าง

1.1 การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่าง

การแยกแบคทีเรียกรดแลคติก ใช้อาหารแข็ง MRS (deMan-Rogosa-Sharpe) ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) ให้มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) เมื่อแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญจะสร้างกรดอินทรีย์ออกมาทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ตรวจพบบริเวณใสรอบโคโลนี ดังภาพที่ 4 ซึ่งจากตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 110 ตัวอย่าง พบว่าแยกได้แบคทีเรียที่มีบริเวณใสรอบโคโลนี และเมื่อยืนยันผลการแยกแบคทีเรียกรดแลคติก โดยตรวจสอบการสร้างเอนไซม์อะเลสและการย้อมสีแบบแกรม พบแบคทีเรียจำนวน 162 ไอโซเลต ติดสีแกรมบวก และให้ผลเป็นลบ จากการทดสอบเอนไซม์อะเลส (ภาคผนวก ข) ดังตารางที่ 2



ภาพที่ 4 การเจริญและบริเวณใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติก (ลูกศรชี้) บนอาหารแข็ง MRS ที่เติม CaCO_3 ให้มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 การแยกแยะที่เรียกรวดแลคติกจากแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะ	จำนวน ไอโซเลต	รหัสเชื้อ
1	ขูดกระดูก	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ขูดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
2	ขูดขบาค่าง	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ขูดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
3	ขูดจามจู้รี	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ขูดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	1	SM001
4	ขูดพุทธรักษา	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ขูดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
5	ขูดแพงพวย	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ขูดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
6	ขูดขบาค่าง	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ขูดมีความชื้นเล็กน้อย	1	SM002
7	ขูดขบาค่าง	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ขูดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
8	ขนมจีนแป็งหมัก	อ. อุ้มทอง จ. สุพรรณบุรี	เป็นแป็งชุ่มน้ำ	-	-
9	ลำไ้ปลาชบะ	ตลาดปากน้ำ จ. สมุทรปราการ	ยังมีความสดอยู่มีสีดำน้ำตาล	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะ	จำนวน ไอโซเลต	รหัสเชื้อ
10	ลำไส้ปลาสำลี	ตลาดปากน้ำ จ. สมุทรปราการ	ยังมีความสดอยู่มีสีดำน้ำตาล	1	SM003
11	ลำไส้ปลาอินทรี	ตลาดปากน้ำ จ. สมุทรปราการ	ยังมีความสดอยู่มีสีดำน้ำตาล	1	SM004
12	ลำไส้ปลาทู	ตลาดปากน้ำ จ. สมุทรปราการ	ยังมีความสดอยู่มีสีดำน้ำตาล	1	SM005
13	ลำไส้ปลาตัวแบน	ตลาดปากน้ำ จ. สมุทรปราการ	ยังมีความสดอยู่มีสีดำน้ำตาล	1	SM006
14	ลำไส้ไก่	เขายุงทอง จ. ชลบุรี	สดมีสีเขียว มีความอูม่น้ำ	6	SM007-SM012
15	ลำไส้ไก่	เขายุงทอง จ. ชลบุรี	ลำไส้ไก่ที่ยังมีความสดอยู่	7	SM013-SM019
16	ลำไส้ปลาทู	ตลาดปากน้ำ จ. สมุทรปราการ	สดมีสีดำน้ำตาล	1	SM020
17	ลำไส้ปลาทรายแดง	ตลาดปากน้ำ จ. สมุทรปราการ	สดมีสีดำน้ำตาล	1	SM021
18	ลำไส้ปลาอินทรี	ตลาดปากน้ำ จ. สมุทรปราการ	สดมีสีดำน้ำตาล	-	-
19	ลำไส้ปลากะพง	ตลาดปากน้ำ จ. สมุทรปราการ	สดมีสีดำน้ำตาล	1	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะ	จำนวน ไอโซเลต	รหัสเชื้อ
20	ลำไ้ปลาหมึก	ตลาดปากน้ำ จ. สมุทรปราการ	สดมีสีดำน้ำตาล	-	-
21	มูลไก่	อ. อุ้มทอง จ. สุพรรณบุรี	แห้ง มีความชื้นน้อย มีสีเขียวปนขาว	6	SM022-SM027
22	มูลไก่	อ. อุ้มทอง จ. สุพรรณบุรี	สดมีสีเขียว มีความอู้มน้ำ	1	SM028
23	มูลไก่	อ. อุ้มทอง จ. สุพรรณบุรี	มีความชื้นเล็กน้อย มีสีเทาปนขาว	2	SM029-SM030
24	มูลไก่	อ. อุ้มทอง จ. สุพรรณบุรี	มีความชื้นเล็กน้อย มีสีดำน้ำตาล	5	SM031-SM035
25	ขอดชะพลู	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ขุดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
26	ขอดปริก	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ขุดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	1	SM036
27	ดอกเข็ม	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ขุดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย ฐานรองดอกมีน้ำเยิ้ม	1	SM037
28	ขอดมะขาม	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ขุดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
29	ขอดอัญชัน	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ขุดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	2	SM038-SM039
30	ขอดผักกูด	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ขุดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะ	จำนวน ไอโซเลต	รหัสเชื้อ
31	ยอดกระถิน	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	1	SM040
32	เกสรกล้วย	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	มีความชื้นเล็กน้อย เกสรมีน้ำเฝิ้ม	1	SM041
33	ยอดตำลึง	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
34	ยอดมะขม	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	1	SM042
35	ยอดมะขาม	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	1	SM043
36	ดอกแก้ว	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ความชื้นเล็กน้อย ใกล้เคียง น้ำหวานเฝิ้มมี สีขาวและสีน้ำตาลบางส่วน	2	SM044-SM045
37	ยอดมะขาม	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
38	ดอกเข็ม	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	1	SM046
39	ใบจามจุรี	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ร่วงจากต้น มีความชื้นเล็กน้อย	1	SM047
40	ดอกเข็ม	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ดอกมีความชื้นเหนียวใกล้เคียง	-	-
41	ดอกเข็ม	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะ	จำนวน ไอโซเลต	รหัสชื่อ
42	ดอกพุทธรักษา	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ดอกมีความชื้นเหี่ยวใกล้ร่วง	1	SM048
43	ดอกพุทธรักษา	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ดอกมีความชื้นเหี่ยวใกล้ร่วง	1	SM049
44	ยอดกระถิน	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	1	SM050
45	ยอดกระถิน	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
46	ยอดขี้เหล็ก	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
47	ดอกมีคี้เมาส์	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	มีความชื้นเหี่ยวใกล้ร่วง	1	SM051
48	ยอดชบา	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	2	SM052-SM053
49	ยอดตะลิงปิง	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	1	SM054
50	ยอดมะขาม	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
51	ยอดมะกัลำต้น	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะ	จำนวน ไอโซเลต	รหัสเชื้อ
52	ดอกชบา	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ร่วงมาจากต้นมีความชื้นเล็กน้อย	1	SM055
53	สับปะรด	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	น้ำน้ำเยิ้ม เป็นแผลขี้เล็กน้อย	2	SM056-SM057
54	ยอดสน	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	1	SM058
55	ดอกกระดุม	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ดอกมีความชื้น	2	SM059-SM060
56	ใบไผ่แห้ง	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ร่วงมาจากต้นมีความชื้นเล็กน้อย	1	SM061
57	ยอดทับทิม	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	1	SM062
58	ดอกพุทธรักษา	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ดอกมีความชื้นเหี่ยวใกล้ร่วง	2	SM063-SM064
59	ดอกพุทธรักษา	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ดอกมีความชื้นเหี่ยวใกล้ร่วง	2	SM065-SM066
60	ดอกกรัก	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ดอกมีความชื้นเหี่ยวใกล้ร่วง	1	SM067
61	ดอกพลูด่าง	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ดอกมีความชื้นเหี่ยวใกล้ร่วง	2	SM068-SM069

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะ	จำนวน ไอโซเลต	รหัสเชื้อ
62	ใบแสงจันทร์	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ร่วงมาจากต้นมีความชื้นเล็กน้อย	3	SM070-SM072
63	ใบโหระพา	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
64	ดอกบัวตอง	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ดอกมีความชื้นเหี่ยวใกล้ร่วง	1	SM073
65	ดอกประดู่	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	มีความชื้นเหี่ยวใกล้ร่วง	2	SM074-SM076
66	ดอกดาวกระจาย	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	มีความชื้นเหี่ยวใกล้ร่วง	1	SM077
67	ยอดพลูด่าง	ถนนอ่อนนุช กรุงเทพมหานคร	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	2	SM078-SM079
68	ดอกจามจุรี	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ดอกมีความชื้นเหี่ยวใกล้ร่วง	1	SM080
69	ดอกแปรงล้างขวด	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ดอกมีความชื้นเหี่ยวใกล้ร่วง	2	SM081-SM082
70	ลำไ้ไก่	อ. อุทอง จ. สุพรรณบุรี	ลำไ้ไก่สดมีความอู้มน้ำ	6	SM083-SM088
71	ลำไ้ไก่	อ. อุทอง จ. สุพรรณบุรี	ลำไ้ไก่สดมีความอู้มน้ำ	8	SM089-SM096

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะ	จำนวน ไอโซเลต	รหัสเชื้อ
72	ลำไส้ไก่	อ. อุ้มทอง จ. สุพรรณบุรี	ลำไส้ไก่สดมีความอู่ม้วน	7	SM097-SM103
73	ลำไส้ไก่	อ. อุ้มทอง จ. สุพรรณบุรี	ลำไส้ไก่สดมีความอู่ม้วน	3	SM104-SM106
74	ขอดมะยม	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ขอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
75	ขอดกาสะลอง	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ขอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
76	ขอดมะรุม	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ขอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	1	SM107
77	ขอดหูกวาง	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ขอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
78	ขอดกาสะลอง	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ขอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
79	ดอกเข็ม	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ดอกมีความชื้นมีน้ำหวานเยิ้ม	-	-
80	ขอดมะขาม	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ขอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
81	ดอกพุทธรักษา	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ขอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	-	-
82	ขอดมะยม	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ขอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	2	SM108-SM109

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะ	จำนวน ไอโซเลต	รหัสเชื้อ
83	ดอกสาละ	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ดอกมีความชื้นเล็กน้อยมีน้ำหวาน เยิ้มใกล้ร่วง	1	SM110
84	ดอกอโศก	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	มีความชื้นมีน้ำหวานเยิ้ม	1	SM111
85	ยอดไทร	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	ยอดอ่อนมีความชื้นเล็กน้อย	1	SM112
86	ดอกแปรงล้างขวด	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	มีความชื้นมีน้ำหวานเยิ้ม	1	SM113
87	ดอกหมาอกผู้	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	มีความชื้นมีน้ำหวานเยิ้มใกล้ร่วง	1	SM114
88	ดอกชมพูพันธุ์ทิพย์	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	มีความชื้นมีน้ำหวานเยิ้มใกล้ร่วง	1	SM115
89	ดอกราชพฤกษ์	ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	มีความชื้นมีน้ำหวานเยิ้มใกล้ร่วง	1	SM116
90	มูลไก่	อ. อุทอง จ. สุพรรณบุรี	ชื้นเล็กน้อยเหนียวเหน็ดสีค้ำน้ำตาล	3	SM117-SM119
91	มูลไก่	อ. อุทอง จ. สุพรรณบุรี	แห้งมีสีเขียวปนขาว มีความอู่ม่น้ำ	2	SM120-SM121
92	มูลไก่	อ. อุทอง จ. สุพรรณบุรี	แห้งมีสีเขียว	1	SM122

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะ	จำนวน ไอโซเลต	รหัสเชื้อ
93	มูลไก่	อ. อุ้มทอง จ. สุพรรณบุรี	เปียกอุ้มน้ำ มีสีเขียวอมขาว	4	SM123-SM126
94	มูลไก่	อ. ท่งใหญ่ จ. นครศรีธรรมราช	เปียก มีสีเขียวอมขาว	1	SM127
95	มูลไก่	อ. ท่งใหญ่ จ. นครศรีธรรมราช	เปียก มีสีดำน้ำตาล	1	SM128
96	มูลไก่	อ. ท่งใหญ่ จ. นครศรีธรรมราช	เปียก มีสีเขียวอมขาว	3	SM129-SM131
97	มูลไก่	อ. ท่งใหญ่ จ. นครศรีธรรมราช	เปียก มีสีเขียว	2	SM132-SM133
98	ແຫນມຫມູ່ຫໍ່ໂບຕອງ	อ. โครราช จ. นครราชสีมา	เนื้อหมูมีสีซีด มีกลิ่นเปรี้ยว	2	SM134-SM135
99	ແຫນມຫມູ່ເຫັດ	อ. อัมพวา จ. ราชบุรี	เนื้อหมูมีสีแดงเข้ม มีกลิ่นเปรี้ยว	2	SM136-SM137
100	ແຫນມຫມູ່	อ. อัมพวา จ. ราชบุรี	เนื้อหมูมีสีแดงเข้ม มีกลิ่นเปรี้ยว	1	SM138
101	ຝັກກາດคอง	ตลาดชลประทาน จ. นนทบุรี	สีเขียวเข้ม	-	-
102	ໄສ້ກອກອີສານ	ตลาดชลประทาน จ. นนทบุรี	มีสีซีด มีกลิ่นเปรี้ยว	4	SM139-SM142
103	ຝັກກາດคอง	ตลาดชลประทาน จ. นนทบุรี	สีเขียวเข้ม	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะ	จำนวน ไอโซเลต	รหัสเชื้อ
104	ແຫນມໝູ	ตลาดชลประทาน จ. นนทบุรี	เนื้อหมูมีสีแดงเข้ม มีกลิ่นเปรี้ยว	2	SM143-SM144
105	ໄສ້ກອກອີສານ	ตลาดกรมประมง ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	มีสีซีด มีกลิ่นเปรี้ยว	3	SM145-SM147
106	ແຫນມເນື້ອ	ตลาดกรมประมง ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	เนื้อมีสีแดงเข้ม มีกลิ่นเปรี้ยว	3	SM148-SM150
107	ແຫນມໝູ	ตลาดกรมประมง ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	เนื้อหมูมีสีแดงเข้ม มีกลิ่นเปรี้ยว	4	SM151-SM154
108	ປລາສັມ	ตลาดกรมประมง ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	สีชมพู มีกลิ่นเปรี้ยว	2	SM155-SM156
109	ໄສ້ກອກເບື້ຽວ	ตลาดอมรพันธ์ ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	มีสีซีด มีกลิ่นเปรี้ยว	3	SM157-SM159
110	ແຫນມເຫິດ	ตลาดอรพันธ์ ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน	มีสีซีด มีกลิ่นเปรี้ยว	3	SM160-SM162

หมายเหตุ — หมายถึง ไม่พบโคโลนีที่สร้างบริเวณใสรอบโคโลนี

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียขนาดใหญ่ มีสมาชิกจำนวนมากและพบว่าในระบบทางเดินอาหารสัตว์ มีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนค่อนข้างมาก โดยตรวจพบแบคทีเรียกรดแลคติกในช่องปากได้มากถึง 10^3 - 10^4 CFU ต่อกรัม กระเพาะอาหารมีจำนวน 10^3 - 10^5 CFU ต่อกรัม ลำไส้เล็กส่วนปลายมีจำนวน 10^3 - 10^7 CFU ต่อกรัม โดยมีแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* จำนวนมากที่สุดและในลำไส้ใหญ่มีจำนวน 10^4 - 10^8 CFU ต่อกรัม (Goktepe *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอีกมากที่รายงานการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ เช่น การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้เล็กของสุกร (ภัทรวดี, 2549) เกริกวุฒิ และ สุชาริณี (2551) พบแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้เป็ด Cosby *et al.* (1997) พบ *Lactobacillus* ในกระเพาะและไส้ติ่งของไก่ Lin *et al.* (2007) แยก *Lactobacillus fermentum* จากระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก และ สุกร Svetoch *et al.* (2011) แยก *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) ได้จากลำไส้สัตว์ปีก เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียขนาดใหญ่ มีสมาชิกจำนวนมาก

ผลการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่าแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้จำนวน 162 ไอโซเลต จากตัวอย่างชนิดต่าง ๆ จำนวน 110 ตัวอย่าง ซึ่งการจากทดลองนี้พบว่าระบบทางเดินอาหารสัตว์เป็นแหล่งตัวอย่างที่แยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้มากที่สุด โดยแยกได้ถึง 75 ไอโซเลต จากตัวอย่างระบบทางเดินอาหารสัตว์ทั้งหมด 28 ตัวอย่าง ดังข้อมูลที่สรุปไว้ในตารางที่ 3 ซึ่งคิดเป็น 46.3 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการที่แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ทั่วไปในระบบทางเดินอาหารสัตว์ตั้งแต่ปาก กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ รวมถึงมูลสัตว์ (Wood and Holzapfel, 1995)

ตารางที่ 3 ตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อและจำนวนไอโซเลตที่แยกได้

ลำดับ	กลุ่มตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตที่แยกได้	ร้อยละของแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด
1	ดอก ใบและยอดของต้นไม้	68	58	35.8
2	ระบบทางเดินอาหารสัตว์	28	75	46.3
3	อาหารหมัก	14	29	17.9

นอกจากตัวอย่างระบบทางเดินอาหารของสัตว์แล้ว ตัวอย่างใบไม้และยอดของต้นไม้ รวมถึงตัวอย่างอาหารหมักก็ตรวจพบแบคทีเรียกรดแลคติกได้เช่นกัน มีการศึกษาเกี่ยวกับการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักนั้นมีย่างแพร่หลาย เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นเป็นต้นเชื้อในการผลิตอาหารหมักได้ เช่น การใช้ *Lactobacillus plantarum* เป็นหัวเชื้อในการผลิตแหมม เพื่อลดระยะเวลาในการหมัก เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์อาหารหมักอื่น ๆ เช่น กิมจิ ผักผลไม้ดอง รวมถึงแหมม ที่มีการหมักแบบพื้นบ้านโดยไม่ใช้หัวเชื้อ ก็สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้เช่นกัน โดยแบคทีเรียนั้นอาจมีการปนเปื้อนมากับวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก Hammes and Vogel (1995) รายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบได้ทั่วไปในหลากหลายสิ่งแวดล้อม เช่น ฟืช สัตว์ และน้ำนมดิบ เป็นต้น สำหรับการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากพืชยังมีการศึกษาน้อย ซึ่งก่อนหน้านี้ Ponce *et al.* (2008) สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากใบพืชที่ปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ และมี *Lactobacillus sucicola* ที่แยกได้จากน้ำเลี้ยงของต้น ไอ้คนในประเทศญี่ปุ่น (Irisawa and Okada, 2009) สำหรับในงานวิจัยนี้ก็พบแบคทีเรียกรดแลคติกได้จากกลุ่มตัวอย่างพืช ได้แก่ ดอก ใบ และ ยอดของต้นไม้ เช่นกัน โดยแยกได้แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 58 ไอโซเลต จากตัวอย่างพืช 68 ตัวอย่าง ซึ่งเป็น 35.8 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนไอโซเลตที่แยกได้ (ตารางที่ 3) โดยพบว่าบางตัวอย่างไม่พบแบคทีเรียกรดแลคติก ขณะที่ในตัวอย่างพืชที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกก็พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนน้อยมาก แตกต่างจากกลุ่มตัวอย่างชนิดอื่น จึงต้องเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารที่เหมาะสม ก่อนนำมาแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกจัดเป็นแบคทีเรียเจริญยาก (fastidious bacteria) เพราะต้องการแร่ธาตุและสารอาหารหลายชนิดเพื่อการเจริญเติบโต (Axelsson, 1998) ดังนั้นสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ของพืช เช่น มีสารอาหารจำกัด รังสี แสงอาทิตย์ และ อุณหภูมิสูง อาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญ และ เพิ่มจำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกทำให้พบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้้น้อย ซึ่งจากงานวิจัยนี้องค์ประกอบของพืชที่แยกเชื้อได้มากที่สุด คือ ดอก ทั้งนี้อาจเนื่องจากดอกไม้มีน้ำหวาน ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกนำไปใช้ในการเจริญได้

1.2 การศึกษาสัณฐานวิทยาของ โคโลนีและเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS ที่เติม CaCO_3 ให้มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ใน candle jar เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมาศึกษาสัณฐานวิทยาของโคโลนี โดยพิจารณารูปร่าง ขนาด และลักษณะโคโลนี (ภาคผนวก ข) และศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยพิจารณารูปร่าง การเรียงตัวของเซลล์ และการติดสีแกรม รวมทั้งการสร้างเอนไซม์อะมิเลส ซึ่งพบว่าทุกไอโซเลตที่แยกได้ให้ผลการทดสอบเป็นลบ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียกรดแลคติก ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สัมถานวิทยาของโคลโลนและเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

รหัสเชื้อ	สีโคลโลน	ขนาดโคลโลน (มม.)	รูปร่าง โคลโลน	ความหนูนของ โคลโลน	ผิวหน้า โคลโลน	ขอบโคลโลน	การติดสี แกรม	รูปร่างเซลล์
SM001	สีขาวใส	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM002	ขาวขุ่น	0.2-0.4	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM003	ขาวใส	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM004	ขาวขุ่น	0.3-0.4	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM005	ขาวใส	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM006	ขาวใส	0.3-0.4	ไม่แน่นอน	เรียบ	เยิ้ม	ขอบไม่เรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM007	ขาวขุ่น	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM008	ขาวใส	0.2-0.4	ไม่แน่นอน	นูนเล็กน้อย	เยิ้ม	ขอบไม่เรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM009	ขาวใส	0.3-0.4	กลม	นูน	เยิ้ม	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM010	ขาวขุ่น	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM011	ขาวขุ่น	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM012	ขาวเหลือง	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM013	ขาวใส	0.1-0.2	กลม	นูน	เยิ้ม	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM014	ขาวขุ่น	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	ขนาดโคโลนี (มม.)	รูปร่าง โคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	การติดสี แกรม	รูปร่างเซลล์
SM015	ขาวใส	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM016	ขาวขุ่น	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM017	ขาวครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM018	ขาวขุ่น	0.3-0.4	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM019	ขาวใส	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM020	ขาว	0.2-0.3	กลม	นูน	แห้งเกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM021	ขาวใส	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM022	ขาวใส	0.2-0.3	กลม	นูน	เยิ้ม	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM023	ขาว	0.2-0.3	ไม่แน่นอน	นูนเล็กน้อย	เยิ้ม	ขอบไม่เรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM024	ขาว	0.2-0.3	กลม	นูน	แห้งเกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM025	ขาวขุ่น	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM026	ขาวขุ่น	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM027	ขาวขุ่น	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	ขนาดโคโลนี (มม.)	รูปร่าง โคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	การติดสี แกรม	รูปร่างเซลล์
SM028	ขาวขุ่น	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM029	ขาวขุ่น	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM030	ขาวครีม	0.2-0.3	ไม่แน่นอน	นูนเล็กน้อย	เยิ้ม	ไม่เรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM031	ขาวขุ่น	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM032	ขาวครีม	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM033	ขาวครีม	0.1-0.2	กลม	นูน	เยิ้ม	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM034	ขาวครีม	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM035	ขาวครีม	0.1-0.2	กลม	นูน	เยิ้ม	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM036	ขาวขุ่น	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM037	ขาวขุ่น	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM038	ขาว	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM039	เหลือง	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM040	เหลือง	0.1-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM041	ขาวครีม	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	ขนาดโคโลนี (มม.)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	การติดสี แกรม	รูปร่างเซลล์
SM042	ขาวขุ่น	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM043	ขาวใส	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM044	ขาวใส	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM045	ขาวขุ่น	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM046	ขาวครีม	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM047	ขาวใส	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM048	ขาวขุ่น	0.3-0.4	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM049	ขาวขุ่น	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM050	ขาวขุ่น	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM051	เหลือง	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM052	ขาวครีม	0.2-0.3	กลม	ไม่นูน	แห้ง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM053	ขาวครีม	0.3-0.4	กลม	ไม่นูน	แห้ง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM054	ขาวครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM055	ขาวเหลือง	0.3-0.4	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	ขนาดโคโลนี (มม.)	รูปร่าง โคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	การติดสี แกรม	รูปร่างเซลล์
SM056	ขาวครีม	0.2-0.3	ไม่แน่นอน	นูน	แห้ง	ขอบไม่เรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM057	ครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM058	ขาวครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	แห้ง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM059	ขาวครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM060	ครีม	0.2-0.4	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM061	ครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM062	ครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM063	ครีม	0.3-0.4	ไม่แน่นอน	นูนเล็กน้อย	ไม่เกลี้ยง	ขอบไม่เรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM064	ครีม	0.3-0.4	ไม่แน่นอน	นูนเล็กน้อย	ไม่เกลี้ยง	ขอบไม่เรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM065	ครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM066	ครีม	0.3-0.5	ไม่แน่นอน	นูนเล็กน้อย	เยิ้ม	ขอบไม่เรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM067	ขาวใส	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM068	ครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM069	ขาวขุ่น	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	ขนาดโคโลนี (มม.)	รูปร่าง โคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	การติดสี แกรม	รูปร่างเซลล์
SM070	ครีม	0.2-0.3	ไม่แน่นอน	นูนเล็กน้อย	เยิ้ม	ขอบไม่เรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM071	ขาวเหลือง	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM072	ครีม	0.2-0.3	ไม่แน่นอน	นูนเล็กน้อย	เยิ้ม	ขอบไม่เรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM073	ขาวเหลือง	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM074	ขาวเหลือง	0.3-0.4	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM075	ขาว	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM076	ครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM077	ครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM078	ครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM079	ครีม	0.2-0.3	ไม่แน่นอน	นูนเล็กน้อย	เยิ้ม	ขอบไม่เรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM080	ครีม	0.2-0.3	กลม	ไม่นูน	แห้ง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM081	ครีม	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM082	ขาวใส	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM083	ขาว	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	ขนาดโคโลนี (มม.)	รูปร่างโคโลนี	ความหนูนของโคโลนี	ผิวหนังโคโลนี	ขอบโคโลนี	การติดสี แกรม	รูปร่างเซลล์
SM084	เหลือง	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM085	ขาว	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM086	ขาวเหลือง	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM087	ขาวครีม	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนต่อกันเป็นสาย
SM088	ขาวครีม	0.2-0.3	ไม่แน่นอน	นูนเล็กน้อย	ไม่เกลี้ยง	ไม่เรียบ	บวก	ท่อนต่อกันเป็นสาย
SM089	ขาวใส	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM090	ขาวขุ่น	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM091	ขาวครีม	0.3-0.4	กลม	นูน	ไม่เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนต่อกันเป็นสาย
SM099	ขาวเหลือง	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนต่อกันเป็นสาย
SM100	ขาวครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM101	ขาว	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM102	ขาวใส	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM103	ขาว	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ไม่เรียบ	บวก	ท่อนยาว

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสชื่อ	สีโคโลนี่	ขนาดโคโลนี่ (มม.)	รูปร่าง โคโลนี่	ความหนูนของ โคโลนี่	ผิวหน้า โคโลนี่	ขอบโคโลนี่	การติดสี แกรม	รูปร่างเซลล์
SM104	ขาว	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM105	ขาวครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนต่อกันเป็นคู่
SM106	ครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM107	ขาว	0.2-0.3	ไม่แน่นอน	นูนเล็กน้อย	เยิ้ม	ไม่เรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM108	ครีม	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM109	ขาว	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM110	ขาว	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM111	ขาว	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนต่อกันเป็นคู่
SM112	ขาวชมพู	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM113	ขาวขุ่น	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM114	ขาวใส	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อน
SM115	ขาวเหลือง	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลมต่อกันเป็นคู่
SM116	ขาวครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลมต่อกันเป็นคู่
SM117	ขาวครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลมต่อกันเป็นคู่

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	ขนาดโคโลนี (มม.)	รูปร่าง โคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	การติดสี แกรม	รูปร่างเซลล์
SM118	ขาวครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลมต่อกันเป็นคู่
SM119	ขาวครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลมต่อกันเป็นคู่
SM120	ขาวครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM121	ขาวครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลมต่อกันเป็นคู่
SM123	ขาวใส	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาวอ้วน
SM124	ขาว	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ไม่เรียบ	บวก	ท่อนยาวพอม
SM125	ขาวขุ่น	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนต่อกันเป็นคู่
SM126	ขาวเหลือง	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนต่อกันเป็นคู่
SM127	ขาวใส	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM128	ขาวขุ่น	0.4-0.5	ไม่แน่นอน	นูนเล็กน้อย	เยิ้ม	ไม่เรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM129	ขาวเหลือง	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนต่อกันเป็นสาย
SM130	ขาวครีม	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM131	ขาว	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM132	ขาว	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว

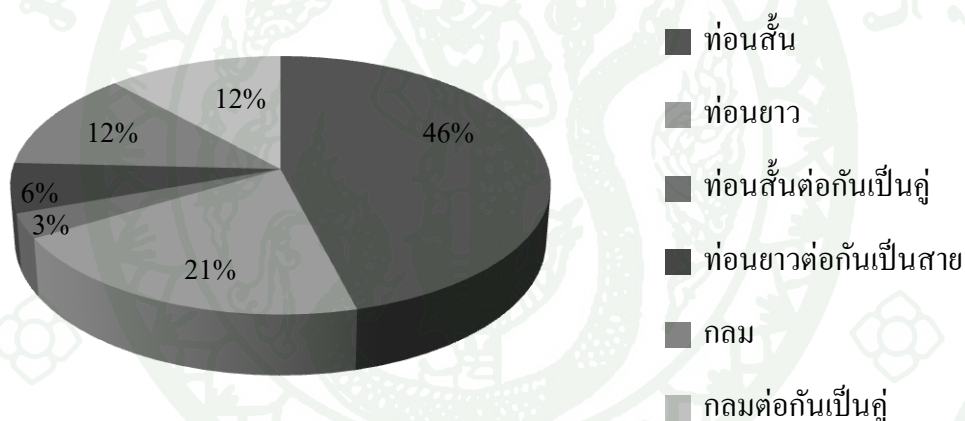
ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสชื่อ	สีโคโลนี	ขนาดโคโลนี (มม.)	รูปร่าง โคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	การติดสี แกรม	รูปร่างเซลล์
SM133	ขาวใส	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM134	ขาวใส	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM135	ขาวใส	0.2-0.3	ไม่แน่นอน	นูนเล็กน้อย	เยิ้ม	ไม่เรียบ	บวก	ท่อนต่อกันเป็นคู่
SM136	ขาวเหลือง	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM137	ขาวเหลือง	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลมต่อกันเป็นคู่
SM138	ขาว	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลมต่อกันเป็นสาย
SM139	ขาวเหลือง	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลมต่อกันเป็นคู่
SM140	ขาวใส	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนต่อกันเป็นสาย
SM141	ขาวเหลือง	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลมต่อกันเป็นคู่
SM142	ขาวใส	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM143	ขาวใส	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM144	ขาวเหลือง	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลมต่อกันเป็นคู่
SM145	ขาวเหลือง	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลมต่อกันเป็นคู่
SM146	ขาวใส	0.2-0.3	กลม	นูนเล็กน้อย	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนต่อกันเป็นสาย

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	สีโคโลนี	ขนาดโคโลนี (มม.)	รูปร่าง โคโลนี	ความหนูนของ โคโลนี	ผิวหน้า โคโลนี	ขอบโคโลนี	การติดสี แกรม	รูปร่างเซลล์
SM147	ขาวขุ่น	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM148	ขาวเหลือง	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลมต่อกันเป็นคู่
SM149	ขาวเหลือง	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM150	ขาวเหลือง	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนต่อกันเป็นคู่
SM151	ขาวเหลือง	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลมต่อกันเป็นคู่
SM153	ขาวใส	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM154	ขาวเหลือง	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM155	ขาวขุ่น	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลม
SM156	ขาวเหลือง	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM157	ขาวเหลือง	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนสั้น
SM158	ขาวใส	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนต่อกันเป็นสาย
SM159	ขาวใส	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลมต่อกันเป็นคู่
SM160	ขาวเหลือง	0.2-0.3	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	กลมต่อกันเป็นคู่
SM161	ขาวครีม	0.2-0.3	ไม่แน่นอน	นูนเล็กน้อย	เยิ้ม	ไม่เรียบ	บวก	ท่อนยาว
SM162	ขาวขุ่น	0.1-0.2	กลม	นูน	เกลี้ยง	ขอบเรียบ	บวก	ท่อนต่อกันเป็นคู่

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 162 ไอโซเลต คิดสี่แกรมบวก และให้ผลทดสอบกะตะเลสเป็นลบ สำหรับรูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้มีรูปร่างเซลล์แบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม คือ รูปท่อนยาว (bacillus) จำนวน 33 ไอโซเลต คิดเป็น 21 เปอร์เซ็นต์ ท่อนสั้น (short rod) 74 ไอโซเลต คิดเป็น 46 เปอร์เซ็นต์ ท่อนสั้นต่อกันเป็นคู่ (diplobacilli) 5 ไอโซเลต คิดเป็น 3 เปอร์เซ็นต์ ท่อนยาวเรียงต่อกันเป็นสาย (lactobacilli) 10 ไอโซเลต คิดเป็น 6 เปอร์เซ็นต์ ท่อนยาวต่อกันเป็นสาย (cocci) 20 ไอโซเลต คิดเป็น 12 เปอร์เซ็นต์ และกลมต่อกันเป็นคู่ (diplococci) 19 ไอโซเลต คิดเป็น 12 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 5 ซึ่งรูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ที่ตรวจพบ จัดว่าเป็นลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียกรดแลคติก ตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology volume 3 (Paul *et al.*, 2009)



ภาพที่ 5 ความถี่ของรูปร่างเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ (ตัวเลขแสดงถึงความถี่ของรูปร่างเซลล์)

ลักษณะพื้นฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยทั่วไป พบว่าเซลล์เดี่ยว ๆ มีทั้งรูปร่างกลม และท่อน การจัดเรียงตัวพบได้ทั้งเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ เป็นคู่ ต่อกันเป็นสาย หรือเกาะกันเป็นกลุ่ม (Axelsson, 2004) อัญชลินทร์ และ จิรัชย์ (2551) คัดเลือก และจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกจาก น้ำนมดิบของแพะเขตภาคกลางของประเทศไทยได้ 304 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียรูปท่อนจำนวน 185 ไอโซเลตและรูปร่างกลม 119 ไอโซเลต เมื่อจัดจำแนกในระดับสกุลของแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าจำแนกออกได้เป็น 5 สกุล คือ *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* และ *Leuconostoc* ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เป็นเพียงลักษณะเบื้องต้น ในการจัดจำแนกและระบุชื่อแบคทีเรานั้นต้องอาศัยข้อมูลผลการทดสอบทางชีวเคมี การใช้แหล่งคาร์บอน และข้อมูลทางชีวโมเลกุล เช่น การศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ร่วมกันจึงจะช่วยให้ระบุชื่อสปีชีส์ของแบคทีเรียได้แม่นยำ

2. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก

2.1 การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร

2.1.1 ความเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรียก่อโรบบางชนิดที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ

ผลการทดสอบการเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติกที่รวบรวมไว้โดยการใช้ไม้น้ำปนปลายสำลีเพาะเชื้อ โดยลากแบคทีเรียกรดแลคติกในแนวตั้งฉากกับแบคทีเรียก่อโรบบนอาหารแข็ง TSA ที่มี yeast extract ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ จะพบบริเวณการยับยั้งตรงบริเวณที่แนวการเจริญของเชื้อที่อยู่ตำแหน่งตั้งฉาก ดังภาพที่ 6 พบว่าจากจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ 162 ไอโซเลต มีแบคทีเรียกรดแลคติกเพียง 47 ไอโซเลต สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ทดสอบ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Enteritidis DMST 15676 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ดังตารางที่ 5

2.1.2 ความเป็นปฏิปักษ์ต่อ *Clostridium perfringens*

นำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 47 ไอโซเลตที่พบว่ามีความเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดที่ใช้ออกซิเจนเพื่อการเจริญมาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *Clostridium perfringens* ATCC 13124 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ โดยใช้วิธีเดียวกับการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคลกลุ่มที่ใช้ออกซิเจน แต่เปลี่ยนอาหารที่ใช้ทดสอบเป็น TSC agar (ภาคผนวก ก) และบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกเพียง 2 ไอโซเลต จากแบคทีเรีย 47 ไอโซเลต ที่นำมาทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 5



ตารางที่ 5 การทดสอบความเป็นปฏิกิริยาของแบคทีเรียกรดแลกติกต่อแบคทีเรียก่อโรควางชนิดในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีก

ลำดับ	รหัส	แบคทีเรียก่อโรคที่ทดสอบ			
		<i>E. coli</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>C. perfringens</i>
		ATCC 25922	DMST 15676	ATCC 13311	ATCC 13124
1	SM016	-	-	+1	-
2	SM017	+1	+1	+1	-
3	SM021	+1	+1	+2	-
4	SM027	+1	+1	+1	-
5	SM053	+2	+2	+2	-
6	SM054	+3	+3	+1	-
7	SM055	+3	+3	+3	-
8	SM056	+1	+1	+1	-
9	SM061	+2	+1	+2	-
10	SM064	+1	-	+1	-
11	SM068	+1	+1	+2	-

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ลำดับ	รหัส	แบคทีเรียก่อโรคที่ทดสอบ			
		<i>E. coli</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>C. perfringens</i>
		ATCC 25922	DMST 15676	ATCC 13311	ATCC 13124
12	SM069	+1	+1	+1	-
13	SM071	+1	+1	+1	-
14	SM072	+1	+1	+1	-
15	SM073	+2	+1	+2	-
16	SM074	+1	+1	+2	-
17	SM075	+1	+1	+1	-
18	SM076	+1	+1	+1	-
19	SM077	+2	+2	+2	-
20	SM081	+2	+2	+2	+3
21	SM090	+1	+1	+1	-
22	SM094	+1	+1	+1	-

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ลำดับ	รหัส	แบคทีเรียก่อโรคที่ทดสอบ			
		<i>E. coli</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>C. perfringens</i>
		ATCC 25922	DMST 15676	ATCC 13311	ATCC 13124
23	SM095	+3	+3	+3	-
24	SM112	+2	+2	+2	-
25	SM114	+1	+1	+2	-
26	SM133	+1	+1	+1	-
27	SM135	+1	+1	+1	-
28	SM136	+1	+1	+1	-
29	SM137	+1	+2	+2	-
30	SM138	+1	+1	+1	-
31	SM139	+1	+1	+1	-
32	SM141	+1	+1	+1	-
33	SM142	+1	+1	+2	-
34	SM143	+2	+2	+2	-

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ลำดับ	รหัส	แบคทีเรียก่อโรคที่ทดสอบ			
		<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Enteritidis</i> DMST 15676	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 13311	<i>C. perfringens</i> ATCC 13124
35	SM144	+2	+1	+2	-
36	SM145	+2	+2	+1	-
37	SM146	+2	+1	+1	-
38	SM147	+2	+1	+1	-
39	SM148	+1	+1	+2	-
40	SM150	+1	+1	+1	-
41	SM151	+1	+1	+1	-
42	SM154	+1	+1	+1	+3
43	SM157	+1	+1	+2	-
44	SM158	+1	+1	+2	-
45	SM159	+1	+1	+2	-

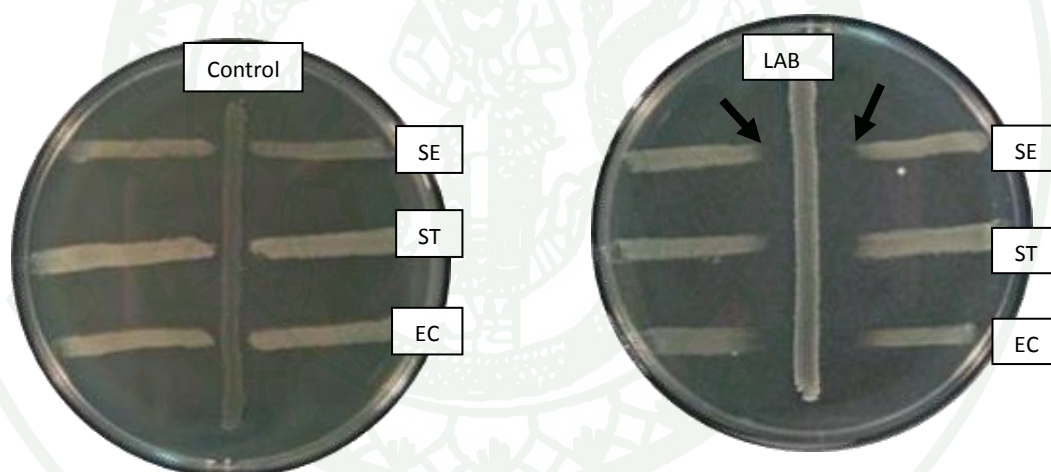
ตารางที่ 5 (ต่อ)

ลำดับ	รหัส	แบคทีเรียก่อโรคที่ทดสอบ			
		<i>E. coli</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>C. perfringens</i>
		ATCC 25922	DMST 15676	ATCC 13311	ATCC 13124
46	SM161	+1	+1	+2	-
47	SM162	+1	+1	+2	-

หมายเหตุ

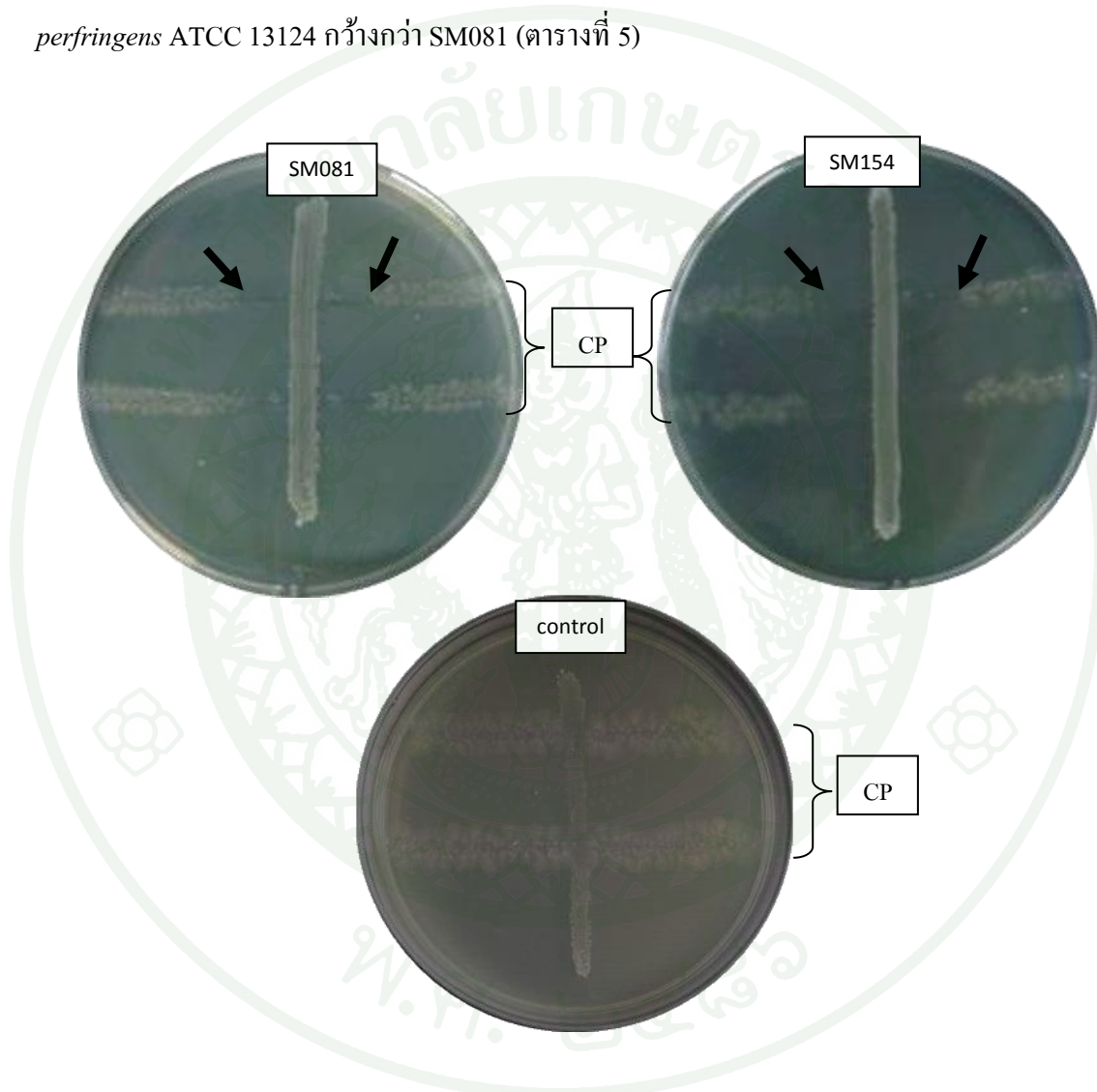
- หมายถึง ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง
- + 1 หมายถึง มีเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง 6 – 9 มิลลิเมตร
- +2 หมายถึง มีเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง 10 – 13 มิลลิเมตร
- +3 หมายถึง มีเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง 14 – 17 มิลลิเมตร

จากการทดสอบความเป็นปฏิกิริยาของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อแบคทีเรียก่อโรค 3 สายพันธุ์ที่ใช้ ออกซิเจนเพื่อการเจริญ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Enteritidis DMST 15676 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ส่วน *Clostridium perfringens* ATCC 13124 เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญ พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 47 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคนิคมที่ใช้ ออกซิเจนเพื่อการเจริญ ได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 5 และลักษณะการยับยั้งแสดงดังภาพที่ 6 ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 47 ไอโซเลตนี้สามารถยับยั้ง *S. Typhimurium* ATCC 13311 ได้ คิดเป็น 29.01 เปอร์เซ็นต์ของไอโซเลตทั้งหมด ส่วนแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922 มีจำนวน 46 ไอโซเลต คิดเป็น 28.40 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียที่สามารถยับยั้ง *S. Enteritidis* DMST 15676 มีจำนวน 45 ไอโซเลต คิดเป็น 27.77 เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียทั้งหมด ดังแสดงในภาพที่ 8 โดยไอโซเลต SM055 และ SM095 ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ดีที่สุด คือ มีเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้ง 14-17 มิลลิเมตร กับแบคทีเรียก่อโรคที่นำมาทดสอบทั้ง 3 สายพันธุ์ (ตารางที่ 5)

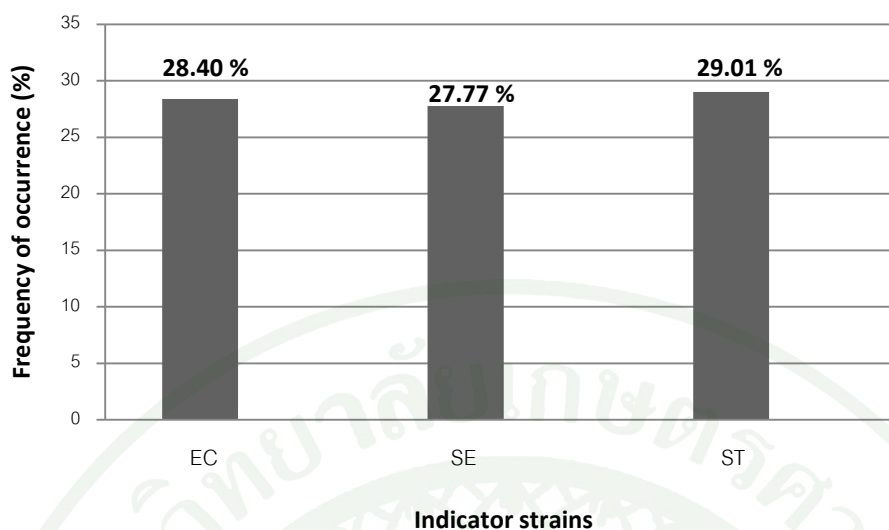


ภาพที่ 6 การทดสอบความเป็นปฏิกิริยาของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อแบคทีเรียก่อโรค *Escherichia coli* ATCC 25922 (EC), *Salmonella* Enteritidis DMST 15676 (SE) และ *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 (ST) บนอาหารแข็ง TSAYE ที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจน ลูกศรแสดงบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ และ control คือ แบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่พบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการศึกษานี้

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติก 47 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคนชนิดที่ใช้ ออกซิเจนเพื่อการเจริญได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังกล่าวข้างต้นมาทดสอบการเป็นปฏิปักษ์กับ *Clostridium perfringens* ATCC 13124 พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลต (คิดเป็น 4.26 เปอร์เซ็นต์ของ แบคทีเรียกรดแลคติก 47 ไอโซเลตที่นำมาทดสอบ) คือ SM081 และ SM154 ที่สามารถยับยั้ง *C. perfringens* ATCC 13124 ได้ ดังแสดงในภาพที่ 7 และยังพบว่าไอโซเลต SM154 มีบริเวณยับยั้ง *C. perfringens* ATCC 13124 กว้างกว่า SM081 (ตารางที่ 5)



ภาพที่ 7 ผลการทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก SM081 และ SM154 ต่อ *Clostridium perfringens* ATCC 13124 (CP) บนอาหารแข็ง TSC ที่ 37 องศาเซลเซียส ใน anaerobic jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลูกศรแสดงบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของ แบคทีเรียทดสอบ และ control คือ แบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่พบกิจกรรมการยับยั้ง แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการศึกษานี้



ภาพที่ 8 ความถี่ของการพบแบคทีเรียกรดแลคติกที่ยับยั้ง *Salmonella* Enteritidis DMST 15676 (SE), *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 (ST) และ *Escherichia coli* ATCC 25922 (EC)

แบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารมีทั้งกลุ่มที่ต้องการและไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ เช่น *Escherichia coli*, *Clostridium* spp. เป็นต้น Gunal *et al.* (2006) พบว่าการเจริญและเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคที่พบมากในไก่ ได้แก่ *E. coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Campylobacter sputorum* และ *Listeria monocytogenes* การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้ จะขัดขวางกลไกการทำงานของเนื้อเยื่อภายในร่างกายสัตว์ แย่งดูดซึมสารอาหารจากสัตว์ และสร้างสารพิษหรือน้ำย่อยที่สามารถทำลายเนื้อเยื่อของสัตว์ ส่งผลเสียต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ และเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคแทรกซ้อนอื่น ๆ จากการทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร จะพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ส่วนใหญ่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ โดยในจำนวนนี้มีเพียง 2 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง *Clostridium perfringens* ได้ด้วย ซึ่งคิดเป็น 4.26 เปอร์เซ็นต์ของไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคระบบทางเดินอาหารกลุ่มที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังนั้นหากแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารทั้งกลุ่มที่ต้องการและไม่ต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญ โดยเฉพาะ *C. perfringens* ซึ่งจะสร้างเอนโดสปอร์เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม จะช่วยลดอัตราการเกิดโรคในระบบทางเดินอาหารได้มากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น Svetoch *et al.*

(2011) รายงานว่า *Lactobacillus alivarius* 1077 (NRRL B-50053) ซึ่งแยกได้จากลำไส้สัตว์ปีก สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. Enteritidis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ได้และนอกจากนี้ยังมีรายงานการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* 0157:H7, *S. Enteritidis* DMST 17368 และ *S. Typhimurium* จากลำไส้ไก่ (ปรีชดา, 2550) ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต SM081 และ SM154 ที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้ นอกจากยับยั้ง *C. perfringens* ได้แล้ว ยังสามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC 25922, *S. Enteritidis* DMST 15676 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ได้อีกด้วย

สำหรับกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติก นอกจากจะเกิดจากกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นแล้ว ยังอาจเนื่องมาจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอทานอล ไดอะซิติก กรดคาร์บอนไดออกไซด์ และ แบคเทอริโอซิน ที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น (De Vuyst and Vandamme, 1994) ซึ่งสารเหล่านี้มีกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันไป กิจกรรมการยับยั้งที่เกิดจากกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติกที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์นั้น ขึ้นกับปริมาณของกรดที่ไม่แตกตัว เนื่องจากกรดอินทรีย์เมื่ออยู่ในรูปไม่แตกตัวจะแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ และเกิดการแตกตัวของกรดภายในเซลล์ให้ประจุลบและโปรตอน ส่งผลให้เกิดการยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จำเป็นต่อเซลล์จุลินทรีย์ (Ammor *et al.*, 2006) หรืออาจเกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เนื่องจากการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ครั้งนี้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีออกซิเจน แบคทีเรียกรดแลคติกจึงอาจมีการสร้าง และ หลั่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมานอกเซลล์ (Seki *et al.*, 2004) เพื่อลดออกซิเจนในรูปที่เป็นพิษต่อเซลล์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารที่มีสมบัติเป็นตัวออกซิไดส์ที่รุนแรง มีผลต่อเซลล์แบคทีเรีย โดยสามารถทำลายกรดนิวคลีอิก และ โปรตีนได้ (Byczkowski and Gessner, 1988) นอกจากนี้การยับยั้งที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากผลร่วมระหว่างกรดแลคติก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Collins and Aramaki, 1980) หรือเกิดจากการที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำได้ Gong *et al.* (2010) รายงานว่า *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 ซึ่งแยกได้จากอาหารหมักสร้าง plantaricin MG ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ *Salmonella* Typhimurium และ *Escherichia coli* นอกจากนี้ยังยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* และ *B. subtilis* ได้อีกด้วย

2.2 การทดสอบความสามารถย่อยไฟเตด

ศึกษาความสามารถย่อยไฟเตดของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยการคัดเลือกบนอาหารแข็ง คัดแปลง MRS-MOPs ที่เติมโซเดียมไฟเตด (ภาคผนวก ก) หากแบคทีเรียกรดแลคติกสร้างเอนไซม์ไฟเตสได้ จะเกิดเป็นบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อ ซึ่งเป็นผลจากการย่อยโซเดียมไฟเตดที่ใช้เป็น วัสดุตั้งต้นอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกไอโซเลตที่แยกได้สร้าง บริเวณใสรอบโคโลนี แต่เนื่องจากเมื่อแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญจะสร้างกรดอินทรีย์ควบคู่ไปด้วย ซึ่งกรดดังกล่าวอาจย่อยโซเดียมไฟเตดได้เช่นกัน ดังนั้นผลการทดสอบบนอาหารแข็งอาจแสดงผลบวกปลอม (false positive) ได้ เพราะบริเวณใสที่เกิดขึ้น อาจเกิดจากการทำปฏิกิริยาของกรด ไม่ใช่การย่อยสลายโดยเอนไซม์ ดังนั้นจึงเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS-MOPs (ภาคผนวก ก) แล้วเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ ซึ่งก็ตรวจไม่พบกิจกรรมของ เอนไซม์ไฟเตสในน้ำเลี้ยงแบคทีเรียทุกไอโซเลตที่นำมาทดสอบ

แม้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทดสอบในงานวิจัยนี้ ไม่สามารถย่อยไฟเตดได้ แต่จาก ความสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญบางชนิดได้ ก็ยังนับว่ามีลักษณะเฉพาะที่น่าสนใจและ เป็นประโยชน์ จึงควรนำไปศึกษาคุณสมบัติอื่น ๆ ที่จะนำไปใช้เป็นแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยอาจ นำไปใช้ในรูปแบบเชื้อเดี่ยวหรือเชื้อผสม โดยผสมร่วมกับจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมการย่อยไฟเตดได้ดีก็ได้

3. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

3.1 การทนอุณหภูมิ

การศึกษาการทนอุณหภูมิของแบคทีเรียไอโซเลต SM081 และ SM154 โดยเปรียบเทียบการ เจริญของแบคทีเรีย เมื่อปรับความขุ่น (OD_{600}) ของเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 0.1 และบ่มที่ 37 และ 45 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญจากค่า OD_{600} ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 การเจริญที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียสของแบคทีเรียไอโซเลต SM081 และ SM154 ในอาหารเหลว MRS ที่เลี้ยงในหลอดทดลอง แบบตั้งทิ้งไว้เฉย ๆ นาน 24 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	OD ₆₀₀	
	SM081	SM154
37	0.74±0.004	0.74±0.004
45	0.38±0.03	0.31±0.005

จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต SM081 และ SM154 สามารถเจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส แต่มีค่าการเจริญน้อยกว่าที่ 37 องศาเซลเซียส โดยค่าการเจริญของแบคทีเรียที่ 45 องศาเซลเซียส ลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ จึงกล่าวได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลตเป็นแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง และที่ 45 องศาเซลเซียสนั้น พบว่า SM081 เจริญได้ดีกว่า SM154 เล็กน้อย สำหรับแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงจะมีข้อได้เปรียบกว่าแบคทีเรียกลุ่มมีโซไฟล์ ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางเท่านั้น เนื่องจากสัตว์ปีกโดยทั่วไปมีอุณหภูมิภายในร่างกายค่อนข้างสูง โดยเฉพาะประมาณ 41 องศาเซลเซียส (เกียรติศักดิ์, 2544) และอุณหภูมิในร่างกายของแม่ไก่ คือ 42 องศาเซลเซียส (ปฐม, 2540) ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติทนร้อน จึงเป็นข้อได้เปรียบที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลตนี้เจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส จึงน่าจะทนอุณหภูมิในระบบทางเดินอาหารสัตว์ได้

3.2 การทนกรดและเกลือน้ำดี

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกนั้น นอกจากคุณสมบัติการทนอุณหภูมิสูงแล้ว ควรค้นหาแบคทีเรียที่เมื่อเข้าสู่ช่องปาก และระบบทางเดินอาหารแล้ว จะสามารถรอดชีวิตและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมของช่องปากมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.2-7.4 ซึ่งเป็นช่วงพีเอชที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้ แต่สภาพแวดล้อมของกระเพาะอาหารจะมีค่าพีเอชช่วงที่เป็นกรด เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีการผลิตกรดไฮโดรคลอริก เพื่อกระตุ้นให้เอนไซม์ที่อยู่ในกระเพาะอาหารทำหน้าที่ย่อย ดังนั้นในกระเพาะอาหารจึงมีค่าพีเอชประมาณ 2.0-3.0 ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่ไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย และในส่วนของลำไส้จะมีน้ำดี ที่สังเคราะห์

จากตับ แต่ส่งไปย่อยไขมันในลำไส้ ซึ่งผนังเซลล์ของแบคทีเรีย มีไขมันเป็นองค์ประกอบ จึงอาจเกิดความเสียหาย เนื่องจากการย่อยของน้ำดี ดังนั้นแบคทีเรียกรดแลคติกที่จะนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกควรทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร (Jacobsen *et al.*, 1999) และเกลือน้ำดีบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น (Gilliland *et al.*, 1984) จากการศึกษาการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดและเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต SM081 และ SM154 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 7



ตารางที่ 7 การรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สภาวะกรดต่าง ๆ และ เกลื่อน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่ 37 องศาเซลเซียส

LAB Strain	Time (h)	การรอดชีวิต (log cfu/ml)					
		control(6.5)	0.3% bile salt	pH2	pH2.5	pH3	pH3.5
SM081	0	7.68(0.02)	7.6(0.01)	7.52(0.02)	7.47(0.02)	7.47(0.01)	7.52(0.04)
	1	8.01(0.02)	7.51(0.02)	2.86(0.1)	6.47(0)	7.45(0.03)	8.21(0.02)
	2	8.42(0.04)	7.76(0.05)	NV	6.27(0.01)	7.46(0)	7.47(0.05)
	3	8.47(0.0)	7.8(0.02)	NV	4.04(0.02)	7.28(0.03)	7.48(0.01)
	4	8.83(0.02)	8.19(0.08)	NV	3.8(0.01)	7.42(0.02)	7.40(0.02)
	5	9.04(0.02)	8.01(0.01)	NV	2.72(0.07)	7.47(0.01)	7.48(0.01)
SM154	0	7.92(0.07)	7.93(0.02)	7.90(0.1)	7.82(0.1)	7.81(0.07)	7.80(0.04)
	1	8.17(0.05)	8.24(0.05)	NV	7.83(0.02)	7.78(0.06)	7.88(0.02)
	2	8.65(0.02)	8.41(0.04)	NV	7.81(0.08)	7.97(0.06)	7.67(0.06)
	3	8.78(0.05)	8.53(0.02)	NV	7.68(0.07)	8.00(0.06)	8.08(0.07)
	4	9.1(0.06)	8.80(0.05)	NV	7.02(0.03)	7.92(0.02)	8.17(0.04)
	5	9.39(0.01)	8.88(0.1)	NV	6.67(0.6)	7.92(0.03)	8.17(0.08)

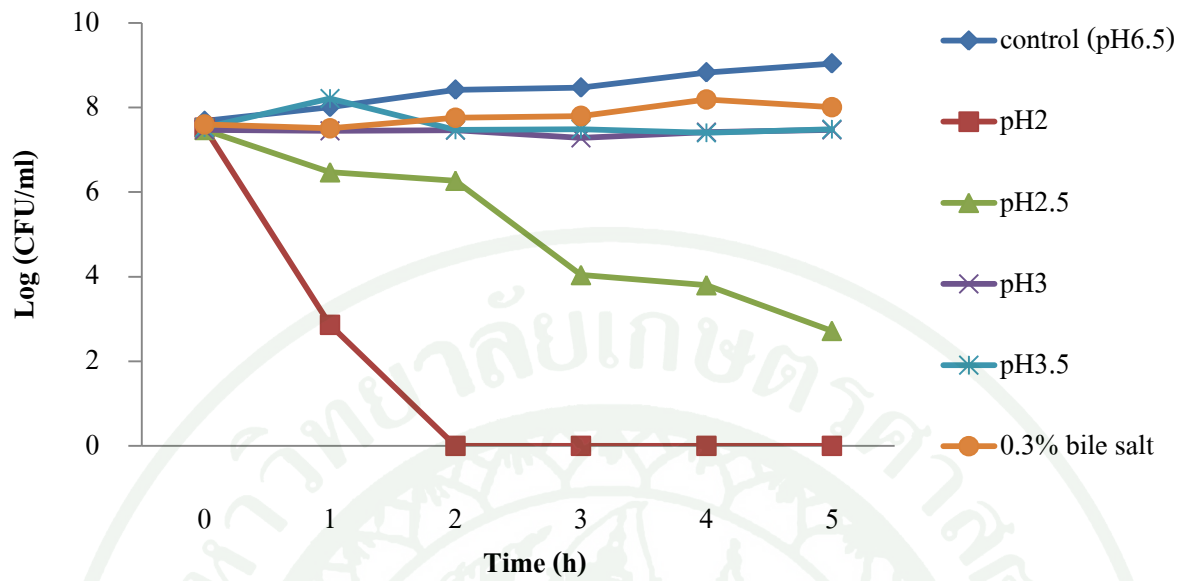
หมายเหตุ NV (No viability) หมายถึง ไม่มีการรอดชีวิต ตัวเลขในวงเล็บ หมายถึง ค่า standard deviation (SD)

การทดสอบความทนกรด ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกดำรงชีวิตอยู่ได้ภายใต้สภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร พบว่าแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลตรอดชีวิตได้น้อยลงที่พีเอช 2 และ 2.5 หลังจากบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยพบว่า แบคทีเรียไอโซเลต SM154 ไม่สามารถรอดชีวิตได้ หลังจากบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 2 ขณะที่ไอโซเลต SM081 พบจำนวนเซลล์ลดลงจาก 7.52 log CFU ต่อมิลลิลิตร เหลือ 2.86 log CFU ต่อมิลลิลิตร หลังบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดังตารางที่ 7 ในขณะที่เมื่อบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับพีเอช 2.5 พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต SM081 และ SM154 มีจำนวนเซลล์ลดลงจาก 7.52 log CFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 2.72 และ 6.67 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ หลังบ่มเป็นเวลา 5 ชั่วโมง โดย SM154 มีการรอดชีวิตลดลงเพียง 1 log CFU ต่อมิลลิลิตร ขณะที่ SM081 มีการรอดชีวิตลดลงถึง 5 log CFU ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงว่า ที่พีเอช 3 และ 3.5 แบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต SM154 รอดชีวิตได้ดีกว่า SM081 ถึง 2.5 เท่า เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 9 และ 10 พบว่าจำนวนแบคทีเรีย SM081 และ SM154 เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย โดยไอโซเลต SM154 มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น ประมาณ 0.4 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 5 ชั่วโมง

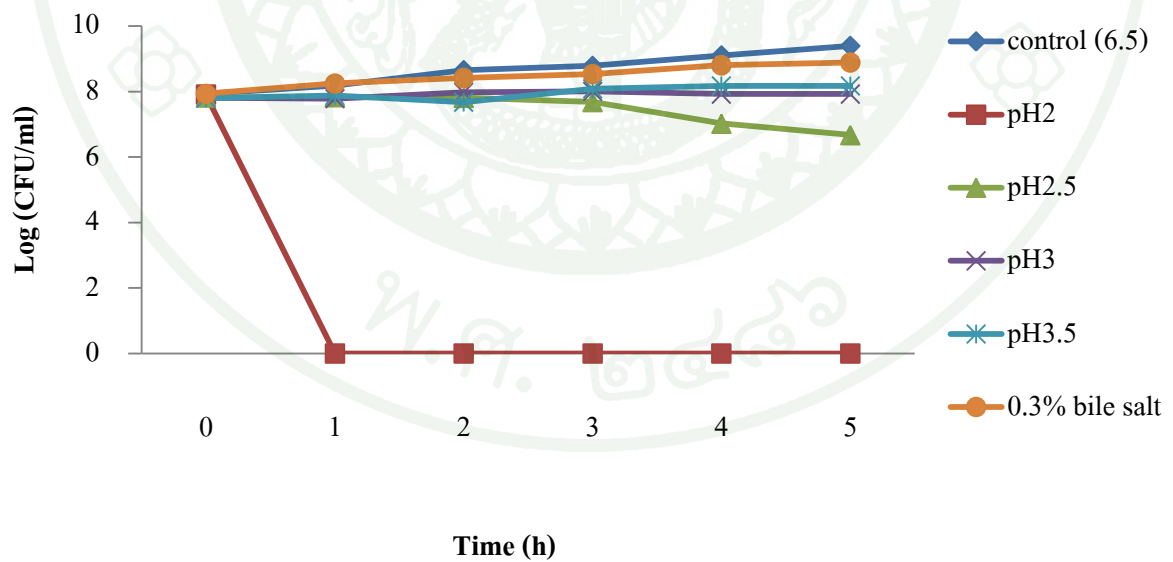
จากผลการทดลองแสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติก SM081 และ SM154 มีแนวโน้มรอดชีวิตได้ภายใต้สภาวะเป็นกรด หรือสภาวะในกระเพาะอาหารของมนุษย์และสัตว์ รวมถึงสัตว์ปีก เช่น ไก่ อันเนื่องมาจากกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้นสูงในน้ำย่อยที่หลั่งออกมา (Charalampopoulos *et al.*, 2003) Musikasang *et al.* (2009) รายงานว่าพีเอชในระบบทางเดินอาหารของไก่อยู่ในช่วง 2.5-4.7 และ ใช้เวลาในการลำเลียงอาหาร 1-3 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลของอาหารสัตว์ นอกจากนี้ Sturkie (1976) รายงานว่าระบบทางเดินอาหารของไก่ ตั้งแต่หลอดลมจนถึงลำไส้เล็กส่วนต้นมีสภาวะเป็นกรด (3.17-6.40) ลำไส้เล็กส่วนปลายจนถึงกลาง ส่วนลำไส้ใหญ่ประมาณ 5.5-6.5 และกระเพาะปัสสาวะ มีสภาวะเป็นกรดจนถึงค่าพีเอช 2.5 ภาวะอาหารของสัตว์จะมีสภาวะเป็นกรด เนื่องจากเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยในกระเพาะอาหาร เช่น pepsinogen เป็นรูป proenzyme เมื่อมี HCl จึงเปลี่ยนเป็นเปปซิน นอกจากนี้ยังพบว่าลูกสัตว์ก่อนหย่านม มีสภาพพีเอชในกระเพาะอาหารเป็นกรดเนื่องจากบริโภคน้ำตาลแลคโตสในนม แล้วเกิดกรดแลคติก ส่งผลให้ในกระเพาะอาหารของลูกสัตว์ก่อนหย่านมมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3-4 (ชรินทร์, 2539) ดังนั้นการที่พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต SM081 และ SM154 ในงานวิจัยนี้ สามารถทนความเป็นกรดได้นานกว่า 5 ชั่วโมง ที่พีเอช 2.5 แสดงว่าทั้ง SM081 และ SM154 เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีแนวโน้มสูงที่จะทนสภาวะกรดในกระเพาะอาหารได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Missotten *et al.* (2009) ซึ่งแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารสัตว์เช่นกัน และคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพในการผลิตอาหารสุกร พบว่า *Lactobacillus mucosa*, *L. brevis*, *L. reuteri*,

L. johnsonii และ *L. plantarum* สามารถเจริญและรอดชีวิตได้นาน 4 ชั่วโมง ในอาหารเหลว MRS ที่พีเอช 2.5 ในขณะที่ *L. lactis* ATCC 11454, *L. paracasei* ATCC 27092, *L. casei* vcATCC 393 และ *L. rhamnosus* ATCC 53103 รอดชีวิตได้เพียง 45 นาที ที่พีเอช 2.5 แต่รอดชีวิตได้นาน 3 ชั่วโมง ที่พีเอช 3 (Andrea *et al.*, 2012) *L. salivarius* SMXD51 รอดชีวิตนาน 3 ชั่วโมง ที่พีเอช 3 (Messaudi *et al.*, 2012) และสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้

น้ำดีสังเคราะห์มาจากตับ แล้วเก็บไว้ในถุงน้ำดี ไม่ถือว่าเป็นน้ำดีเป็นเอนไซม์ เพราะจะเปลี่ยนสภาพไปจากเดิม เมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุด หลังจากการกินอาหารจะมีน้ำดีหลังออกมาขังลำไส้เล็กส่วนต้น และเนื่องจากเชื้อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมีส่วนประกอบของไขมันและกรดไขมันที่ถูกทำลายได้โดยน้ำดี (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002) การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการอยู่รอดในสภาวะที่มีน้ำดี จึงเป็นคุณสมบัติอีกประการหนึ่งที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกผลการศึกษาความทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก SM081 และ SM154 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่เติมเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ 170 รอบต่อนาที จากนั้นสุ่มเก็บตัวอย่างทุก ๆ ชั่วโมง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต SM081 และ SM154 สามารถรอดชีวิตและเพิ่มจำนวนได้ในอาหารเหลว MRS ที่เติมเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มเป็นเวลา 5 ชั่วโมง โดยไอโซเลต SM081 และ SM154 เพิ่มจำนวนจากเดิม คือ 7.60 และ 7.93 log CFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 8.01 และ 8.88 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต SM081 และ SM154 มีแนวโน้มที่จะรอดชีวิตและเจริญอยู่ภายในลำไส้ของสัตว์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่รายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus* ssp. *L. plantarum* และ *Weissella confusa* 31 สามารถเจริญในอาหารเหลว MRS ที่เติมเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ (Tanja *et al.*, 2010; Salah *et al.*, 2012 and Lee *et al.*, 2012) สามารถรอดชีวิตและเจริญอยู่ภายในลำไส้ และใช้เป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกได้



ภาพที่ 9 การรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต SM081 ที่สภาวะกรดต่างๆ และ เกลือ น้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่ 37 องศาเซลเซียส

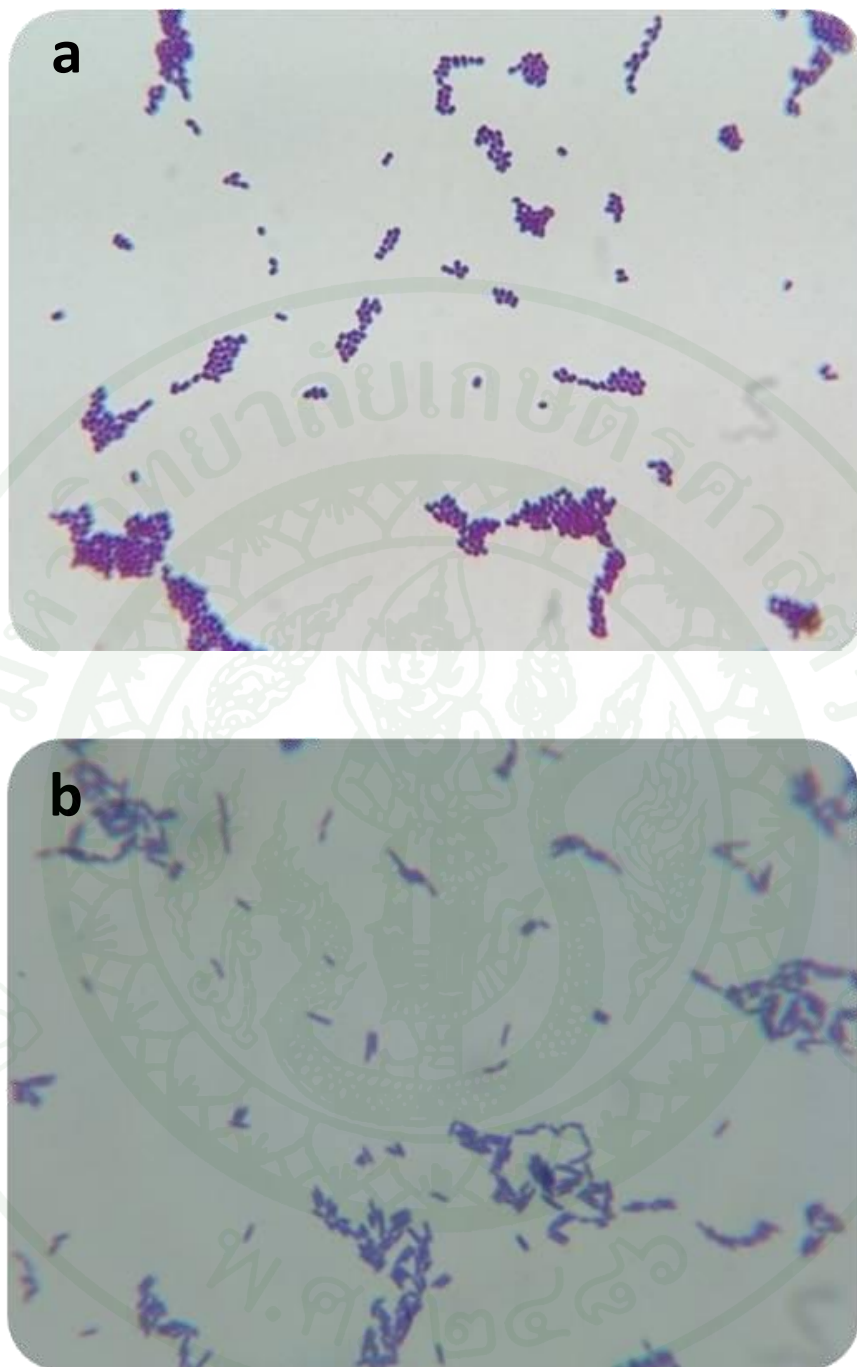


ภาพที่ 10 การรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต SM154 ที่สภาวะกรดต่างๆ และ เกลือ น้ำดี ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่ 37 องศาเซลเซียส

เมื่อเปรียบเทียบภาพที่ 9 และ 10 จะเห็นได้ชัดว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต SM154 สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด และมีเกลือน้ำดี ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่ 37 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าไอโซเลต SM081 ถึงแม้ว่าไอโซเลต SM081 จะทนความเป็นกรดที่ค่าพีเอช 2 ได้นานกว่า ซึ่งอาจเนื่องจาก SM154 เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากແໜ່ມ เป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีพีเอชต่ำ ซึ่งการหมักແໜ່ມต้องใช้ระยะเวลาถึง 3 วัน ซึ่งอาจมีการปรับตัวให้ค่อย ๆ ทนกรดได้ เพราะค่าพีเอชของແໜ່ມโดยทั่วไปอยู่ที่พีเอช 4.6 หรือต่ำกว่านี้ (Jaichumjai *et al.*, 2010) จึงส่งผลให้แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากແໜ່ມสามารถทนกรดได้

4. การจัดจำแนกและระบุชื่อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก SM081 และ SM154 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูล EzTaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต SM081 เหมือนกับ *Weissella paramesenteroides* ATCC 33313 โดยแสดงค่าความเหมือนเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาศัณฐานวิทยาของเซลล์ของแบคทีเรียไอโซเลต SM081 ที่พบว่าเซลล์มีรูปร่างกลม ดิกลีแกรมบวก จัดเรียงตัวเป็นคู่ และต่อกันเป็นสาย (ภาพที่ 11a) รวมทั้งผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์อะคะเลสที่เป็นบวก เช่นเดียวกับ *Weissella paramesenteroides* (Paul *et al.*, 2009) สำหรับไอโซเลต SM154 นั้นพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA เหมือนกับ *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* ATCC 14917 โดยแสดงค่าความเหมือนเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งก็สอดคล้องกับผลการศึกษาศัณฐานวิทยาของเซลล์ของแบคทีเรียไอโซเลต SM154 ที่พบว่าเซลล์มีรูปร่างท่อน ดิกลีแกรมบวก จัดเรียงตัวทั้งแบบที่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสาย (ภาพที่ 11b) และมีผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์อะคะเลสที่เป็นบวกเช่นกัน (Paul *et al.*, 2009) ดังนั้นจึงสรุปว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต SM081 และ SM154 คือ *W. paramesenteroides* และ *L. plantarum* subsp. *plantarum* ตามลำดับ (ตารางที่ 8)



ภาพที่ 11 ลักษณะรูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต SM081 (a) และ SM154 (b) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล EzTaxon – e

Isolates	Closest species	Similarity (%)	Diff/Total nt	Results
SM081	<i>Weissella paramesenteroides</i> ATCC 33313 ^T (AB023238)	100	0/1284	<i>Weissella paramesenteroides</i>
SM154	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> ATCC 14917 ^T (AJ965482)	100	0/1297	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติม แคลเซียมคาร์บอเนต ให้มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ จากตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ จำนวน 110 ตัวอย่าง แยกได้แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 162 ไอโซเลต เมื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดคิดสี่แกรมบวกและให้ผลทดสอบคละเลสเป็นลบ การศึกษารูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ พบว่าแบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม คือ รูปท่อนยาวจำนวน 74 ไอโซเลต ท่อนสั้น 33 ไอโซเลต ท่อนสั้นต่อกันเป็นคู่ 5 ไอโซเลต ท่อนยาวต่อกันเป็นสาย 10 ไอโซเลต กลม 20 ไอโซเลต และ กลมต่อกันเป็นคู่ 19 ไอโซเลต

การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ต่อแบคทีเรียก่อโรค 3 สายพันธุ์ คือ *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Enteritidis DMST 15676 และ *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติก 47 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 สายพันธุ์ดังกล่าว เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 47 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *Clostridium perfringens* ATCC 13124 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญ พบว่ามีแบคทีเรียเพียง 2 ไอโซเลตที่ยับยั้ง *C. perfringens* ATCC 13124 ได้ คือ ไอโซเลต SM081 และ SM154 นอกจากนี้ไอโซเลต SM154 มีบริเวณยับยั้ง *C. perfringens* ATCC 13124 กว้างกว่าไอโซเลต SM081 อย่างไรก็ตามไม่พบการสร้างเอนไซม์ไฟเตสในแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลตนี้ แต่แบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง โดยเจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส และสามารถอยู่รอดได้ในอาหารที่มีพีเอช 2.5 และมีเกลือน้ำดีความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต SM081 และ SM154 คือ *Weissella paramesenteroides* และ *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* ตามลำดับ

ผลการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นสำหรับ โปรไบโอติกของ *Weissella paramesenteroides* SM081 และ *Lactobacillus plantarum* SM154 แสดงให้เห็นว่า *W. paramesenteroides* SM081 และ *L. plantarum* SM154 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคนางชนิดในระบบทางเดินอาหารสัตว์ทั้งที่ต้องการและไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญบางชนิด เจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังสามารถรอดชีวิตในสภาวะเป็นกรดมีค่าพีเอช 2.5 และเพิ่มจำนวนในสภาวะที่มีเกลือ น้ำดี ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ จึงคาดว่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติก เป็นแบคทีเรียที่ตายง่าย ดังนั้นหากจะนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ จำเป็นต้องมีการศึกษาความสามารถการรอดชีวิตในกระบวนการผลิต และระหว่างการเก็บรักษาอาหารสัตว์ นอกจากนี้ควรศึกษาความสามารถการยึดเกาะเซลล์ของแบคทีเรียกรดต่อเซลล์เยื่อของอวัยวะภายในทางเดินอาหารในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากความสามารถการยึดเกาะเซลล์เยื่อของอวัยวะภายในทางเดินอาหาร เป็นอีกคุณสมบัติหนึ่งของโปรไบโอติก เพื่อให้แน่ใจว่า *Weissella paramesenteroides* SM081 และ *Lactobacillus plantarum* SM154 สามารถนำมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพจริง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- เกริกวุฒิ รุ่งอมรชัย และ สุชาริณี เทียงแท้. 2551. การแยกและการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอซินจากลำไส้เป็ด. ปัญหาพิเศษ, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- เกียรติศักดิ์ สร้อยสุวรรณ. 2544. การผลิตสัตว์ปีก. คณะสัตวศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตนครศรีธรรมราช, นครศรีธรรมราช.
- คมแข พิลาสมบัติ จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และ อติสร เสวตวิวัฒน์. 2553. สมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน ซึ่งคัดแยกได้จากระบบทางเดินอาหารของปลากะพง. ว. เกษตรพระจอมเกล้า 28(3): 1-8.
- คมแข พิลาสมบัติ นवलพรรณ งามยี่สุน และ อติสร เสวตวิวัฒน์. 2553. การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lactobacillus salivarius* K4 ที่แยกจากลำไส้ไก่. ว. เกษตรพระจอมเกล้า 28(2): 19-28.
- จุฑาทิพย์ บุญเกิด และ วิเชียร ลีลาว์ชรรมาศ. 2548. การคัดเลือกและจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำนมข้าวเพื่อผลิตโยเกิร์ต. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ชรินทร์ เทียวจรัส. 2539. การใช้โปรไบโอติก เอ็นไซม์ และกรดอินทรีย์ในอาหารสัตว์. ว. สัตวบาล 6(32): 23-33.
- ชลัท ศานติวรางคณา. 2542. การแยกและการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจากน้ำนมโคดิบในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- บัวสาย เพชรสุริยวงศ์. 2553. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากมูลลูกสุกร, น. 51-60. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48 (สาขาวิทยาศาสตร์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- ปฐุม เลาหะเกษตร. 2540. การเลี้ยงสัตว์ปีก. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์ริ้วเขียว, นนทบุรี.
- ปริยดา ตันจักร. 2550. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปิยะมาศ ศรีภูมิ. 2547. การแยกและการคัดเลือก *Bifidobacteria* เพื่อเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกในมนุษย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- ปรีชา ภูมิพื้นผล. 2550. การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีเรียโอซินจากระบบทางเดินอาหารของปลาสวยงาม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ไพรัตน์ ศรีแสง และ วิชัย ลีลาวัชรมาศ. 2553. ความไวต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อแลคโตบาซิลไลโปรไบโอติกที่แยกได้จากมูลไก่. ว. วิจัย มข. 15 (8): น 689-697.
- พงษ์เทพ วิไลพันธ์. 2546. แบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในปลาร้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ภัทรวดี ณ สงขลา. 2549. การคัดเลือกและศึกษาลักษณะของแลคโตบาซิลไลเป็นโปรไบโอติกสำหรับสุกรในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สาโรช โกษารักษ์. 2549. การผลิตแบคทีเรียโอซินจาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- สุนทรี เซ็นติยะนนท์. 2552. การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอซินและแยกเชื้อแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกจากลำไส้ไก่กระทง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง. 2547. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์และคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อใช้เป็นก้ำเชื้อขนมจีนแป้งหมัก, น.307-314. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 (สาขาสัตว). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อัญชลินทร์ สิงห์คำ และ จิรัชย์ กาญจนพฤตพิงศ์. 2551. การคัดเลือกและจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากน้มนมดิบของแพะในเขตภาคกลางของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Aguirre, M., D. Morrison, B.D. Cookson, F.W. Gay and M. D. Collins. 1993. Phenotypic and phylogenetic characterization of some *Gemella*-like organisms from human infections of *Dolosigranulum pigrum* gen. nov., sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 44: 370.
- Ammor, S., G. Tauveron, E. Dufour and I. Chevallier. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control.** 17: 454–461.
- Andrea, M.M., R.A. Leandro, R. Javier, M.B. Honorina, N. Navasa, R.G.A. Marí and Á.F. Miguel. 2012. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **J. Funct. Food.** 4531–541.
- Angelis, M.D., S. Siragusa, L. Caputo, A. Ragni, R. Burzigotti and M. Gobbetti. 2007. Survival and persistence of *Lactobacillus plantarum* 4.1 and *Lactobacillus reuteri* 3S7 in the gastrointestinal tract of pigs. **Vet. Microbiol.** 123: 133–144.
- Arqués, J.L., E. Rodríguez, M. Nuñez and M. Medina. 2011. Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. **Food Control.** 22: 457-461.

- Atassi F. and A.L. Servin. 2010. Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120.1 against enteric, uropathogenic and vaginosis associated pathogens. **FEMS Microbiol. Lett.** 304 (1): 29-38.
- Axelsson, L.T. 1993. Classification and physiology, pp. 1-63. In S. Salminen and A. Von Wright, eds. **Lactic acid bacteria**. Marcel Dekker Inc. New York.
- _____. 2004. Classification and physiology, pp. 1-72. In S. Salminen and A. Von Wright, eds. **LAB: microbiology and functional Aspects**. Marcel Dekker Inc. New York.
- Bari, M., L. Ukuku, D.O. Kawasaki, T. Inatsu, Y. Isshiki and S. Kawamoto. 2005. Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid, and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. **J. Food Prot.** 68: 1381-1387.
- Brashears, M.M. and W.A. Durre. 1999. Antagonistic action of *Lactobacillus lactis* toward *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157: H7 during growth and refrigerated storage. **J. Food Prot.** 62: 1336-1340.
- Byczkowski, J.Z. and T. Gessner. 1988. Biological role of superoxide ion-radical. Minireview. **Int. J. Biochem.** 20: 569-580.
- Charalampopoulos, D., S.S. Pandiella and C. Webb. 2003. Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potential probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. **Int. J. Food Microbiol.** 82: 133-141.
- Chavasirikunton, V., S. Vatanyoopaisarn and C. Phalakornkule. 2007. Bacteriocin-like activity from *Weissella confuse* and *Pediococcus acidilactici* isolated from traditional Thai fermented sausages. **J. Cult. Collect.** 5.

Collins, E.B. and P. Hardt. 1980. Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*. **J. Dairy Sci.** 63: 830-832.

_____ and K. Aramaki. 1980. Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. **J. Dairy Sci.** 63: 353-357.

Collins, M.D., J. Samelis, J. Metaxopoulos and S. Wallbanks. 1993. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. **J. Appl. Bacteriol.** 75: 595-603.

_____, M.A. Hutson, G. Foster, E. Falsen and N. Weiss. 2002. *Isobaculum melis* gen. nov., sp. nov., a *Carnobacterium*-like organism isolated from the intestine of a badger. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 52: 207-210.

_____, A. Wiernik, E. Falsen and P.A. Lawsom. 2005. *Atopococcus tabaci* gen. nov., sp. nov., a novel Gram-positive, catalase-negative, coccus-shaped bacterium isolated from tobacco. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55: 1693-1696.

Cosby, D.E., S.E. Craven, M.A. Harrison and N.A. Cox. 1997. Bacterial isolates from a chicken gizzard and ceca with *in vitro* inhibitory activity against *Salmonella typhimurium*. **J. Food Prot.** 60 (20): 120-124.

Cotta, M.A., T.R. Whitehead and R.L. Zeltwanger. 2003. Isolation, Characterization and comparison of bacteria from swine faeces and manure storage pits. **Environ. Microbiol.** 5: 737-745.

- De Angelis, M., G. Gallo, M.R. Corbo, L.H. Paul, McSweeney, M. Faccia, M. Giovine and M. Gobbetti. 2003. Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. **Int. J. Food Microbiol.** 87: 259-270.
- De Keersmaecker, S.C., T.L. Verhoeven, J. Desair, K. Marchal, J. Vanderleyden and I. Nagy. 2006. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. **FEMS Microbiol. Lett.** 259: 89-96.
- De Vuyst, L. and E.J. Vandamme. 1994. Their practical importance in bacteriocin of lactic acid bacteria. pp. 1-89. In L.D. Vuyst and E.J. Vandamme, eds. **Lactic acid bacteria and bacteriocins.** Blackie Academic and Professional, Glasgow.
- Dicks, L.M.T., F. Dellaglio and M.D. Collins. 1995. Proposal of reclassify *Leuconostoc* as *Oenococcus oeni* coring. gen. nov., comb. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 45: 395-397.
- Eklund, T. 1984. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. **Int. J. Food Microbiol.** 1: 179-185.
- Farber, J. M. 1991. Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology-a review. **J. Food Protect.** 54: 58-70.
- Fayol-Messaoudi, D., C.N. Berger, M.H. Coconnier-Polter, V. Liévin-Le Moal and A.L. Servin. 2005. pH-, lactic acid-, and non-lactic acid dependent activities of probiotic lactobacilli against *Salmonella enteric* Serovar Typhimurium. **Appl. Environ. Microbiol.** 71: 6008-6013.
- Franz, C.M., M. Du Toit, N.A. Olasupo, U. Schillinger and W.H. Holzapfel. 1998. Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BEF 905 from ready to eat salad. **Let. Appl. Microbiol.** 76: 231-235.

- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.** 66: 365-378.
- Garbutt, J. 1997. **Essentials of Food Microbiology.** Arnold, London, England.
- Garneau, S., N.I. Martin and J.C. Vederas. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria . **Biochimie.** 84: 577-592.
- Garriga, M., M. Pascual, J.M. Monfort and M. Hugas. 1998. Selection of Lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. **J. Appl. Microbiol.** 84: 125-132.
- Giang, H.H., T.Q. Viet, B. Ogle and J.E. Lindberg. 2010. Growth performance, digestibility, gut environment and health status in weaned piglets fed a diet supplemented with potentially probiotic complexes of lactic acid bacteria. **Livestock Sci.** 129: 95-103.
- Gilliland, S.E., L. Speck, T.E. Staley and L.J. Bush. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. **J. Dairy Sci.** 67: 3045-3051.
- Goktepe, I., V.K. Juneja and M. Ahmedna. 2006. **Probiotics in food safety and human health.** Taylor and Francis group. United States.
- Gong, H.S., X.C. Meng and H. Wang. 2010. Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from “Jiaoke”, a traditional fermented cream from China. **Food Control.** 21: 89-96.
- Greiner, R. U. Konietzny. 1996. Construction of a bioreactor to produce special breakdown products of phytate. **J. Biotechnol.** 48: 153-159.
- Grimoud, J., H. Durand, C. Courtin, P. Monsan, F. Ouarné, V. Theodorou and C. Roques. 2010. *In vitro* screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. **Anaerobe.** 16: 493-500.

- Gunal, M., G. Yayli, O. Kaya, N. Karahan and O. Sulak. 2006. The effects of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. **Int. J. Poult. Sci.** 5(2): 149-155.
- Hammes, W.P. and R.F.Vogel. 1995. The genus *Lactobacillus*, pp. 19-54. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel., eds. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Blackie Academic and Professional, London.
- Hansen, J. N. 1994. Nisin as a model food preservative. **Crit. Rev. Food Sci Nutr.** 34: 69-93.
- Harland, B. F. and G. Narula. 1999. Food phytate and its hydrolysis products. **Nutrition Res.** 19 (6): 947-961.
- Haros, M., M. Bielicka and Y. Sanz. 2005. Phytase activity as a novel metabolic feature in *Bifidobacterium*. **Lett. Microbiol.** 247: 231-239.
- _____, _____ and _____. 2007. Myo-inositol hexakisphosphate degradation by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. **Int. J. Food Microbiol.** 117: 76-84.
- Havenaar, R., B.T. Brink and J.H. Huis in't Veld. 1992. **Selection of strains for Probiotic use.** pp. 209–221. In R. Fuller., eds. *Probiotics: The Scientific Basis*. Chapman and Hall, London.
- Holzapfel, W.H., P. Haberer, R. Geisen, J. Bjorkroth and U. Schillinger. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. **Am. J. Clin. Nutr.** 73: 365-373.
- Irisawa, T. and S. Okada. 2009. *Lactobacillus sucicola* sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from oak tree (*Quercus* sp.) sap. **Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.** 59: 2662–2665.

- Jacobsen, C.N., V.R. Nielsen, A.E. Hayfor, P.L. Molle, K.F. Michaelsen, A. Paerregaard, B. Sandstrom, M. Tvede and M. Jakobsen. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* sp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 4949–4956.
- Jaichumjai, P., R. Valyasevi, A. Assavanig and P. Kurdi. 2010. Isolation and characterization of acid-sensitive *Lactobacillus plantarum* with application as starter culture for Nham production. **Food Microbiol.** 27: 741-748.
- Jay, J.M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. **Appl. Environ. Microbiol.** 44: 525-532.
- _____. 1986. **Modern food microbiology.** Van Nostrand Reinhold, New York.
- Joint FAO/WHO Expert Consultation. 2001. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** Available Source: http://www.who.int/Foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf, June 10, 2013.
- Kanbar, G., W. Engels, G.J. Nicholson, R. Hertle and G. Winkelmann. 2004. Tyramine functions as atoxin in honey bee larvae during Varroa-transmitted infection by *Melissococcus pluton*. **FEMS Microbiol. Lett.** 234: 149-154.
- Kang, D.H. and D.Y.C. Fung. 1999. Effect of diacetyl on controlling *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in the presence of starter culture in a laboratory medium and during meat fermentation. **J. Food Prot.** 62 (9): 975-979.
- Kirtzalidou, E., P. Pramateftaki, M. Kotsou and A. Kyriacou. 2011. Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota. **Anaerobe.** 17: 440-443.

- Kong, S. and A.J. Davidson. 1980. The role of interactions between O_2 , H_2O_2 , $\cdot OH$, \bar{e} and O_2^- in free radical damage to biological systems. **Arch Biochem. Biophys.** 204: 18-29.
- Konietzny, U. and R. Greiner. 2002. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). **Int. J. Food Sci. Technol.** 37: 791-812.
- Lane, D.J. 1991. Bacterial species identification. pp. 115–175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow, eds. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Wiley, New York.
- Lawson, P.A., G. Foster, E. Falsen, M. Ohlen and M.D. Collins. 2000. *Atopobacter phoceae* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium isolated from common seals. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 50: 1755-1760.
- La Ragione, R. M., A. Narbad, M. J. Gasson, and M. J. Woodward. 2004. *In vivo* characterization of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. **Lett. Appl. Microbiol.** 38: 197-205.
- Lee, K.W., J.Y. Park, H.R. Jeong, H.J. Heo, N.S. Han and J.H. Kim. 2012. Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces. **Anaerobe.** 18: 96-102.
- Lilly, D.M. and R.H. Stillwell. 1965. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Sci.** 147: 747–748.
- Lin, W.H., Y. Bi, S.H. Jang and H.Y. Tsen. 2007. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. **Anaerobe.** 13(3-4): 107-113.
- Lindgren, S.E. and W.J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiol. Rev.** 87: 149-163.

- Manca de Nadra, M.C., M.E. Fariás, E. Pueyo and M.C. Polo. 2005. Protase activity of *Oenococcus oeni* viable cell on red wine nitrogenous macromolecular fraction in presence of SO₂ and ethanol. **Food Control**. 16: 851-854.
- María, C.P., M. Haros, Y. Sanz and C. M. Rosell. 2008. Selection of lactic acid bacteria with high phytate degrading activity for application in whole wheat breadmaking. **LWT - Food Sci. Technol.** 41(1): 82–92.
- Maragkoudakis, P.A., W. Chingwaru, L. Gradisnik, E. Tsakalidou and A. Cencic. 2010. Lactic acid bacteria efficiently protect human and animal intestinal epithelial and immune cells from enteric virus infection. **Int. J. Food Microbiol.** 141: 91-97.
- Martinez, R.C., M. Wachsman, N.I. Torres, J.G. LeBlanc, S.D. Todorov and B.D. Franco. 2013. Biochemical, antimicrobial and molecular characterization of a noncytotoxic bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST71KS. **Food Microbiol.** 34(2): 376–381.
- Matamoros, S., M.F. Pilet, F. Gigout, H. Prévost and F. Leroi. 2009. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. **Food Microbiol.** 26: 638–644.
- Matthies, C., A. Gössner, G. Acker, A. Schraman and H.L. Dark. 2004. *Lactovum miscens* gen. nov., sp. nov., an aerotolerant, psychrotolerant, mixed-fermentative anaerobe from forest soil. **Res. Microbiol.** 155: 847-854.
- Mattila-Sandholm, T., P. Myllarinen, R. Crittenden, G. Mogensen, R. Fonden and M. Saarela. 2002. Technological challenges for future probiotic foods. **Int. Dairy J.**12: 173-182.
- Mayr, R., M. Fricker, A. Maoz and S. Scherer. 2004. Anti-listerial activity and biodiversity of cheese surface cultures: influence of the ripening temperature regime. **Eur. Food Res. Technol.** 218(3): 242-247.

- Messaoudi, S., A. Madi, H. Prévost, M. Feuilloy, M. Manai, X. Dousset and N. Connil. 2012. *In vitro* evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* SMXD51. **Anaerobe**. 18(6): 584–589.
- Missotten, J.A.M., J. Goris, J. Michiels, E.V. Coillie, L. Herman, S.D. Smet, N.A. Dierick and M. Heyndrickx. 2009. Screening of isolated lactic acid bacteria as potential beneficial strains for fermented liquid pig feed production. **Anim. Feed Sci. Technol.** 150: 122-138.
- Montville, T. J., K. Winkowski and R. D. Ludescher. 1995. Models and mechanisms for bacteriocin action and application. **Int. Dairy J.** 5:797–814.
- Murry, A.C., J.A. Hinton and H. Morrison. 2004. Inhibition of Growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Clostridium perfringens* on chicken feed media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. **Int. J. Poult. Sci.** 3(9): 603-607.
- Musikasang, H., N. Sohsomboon, A. Tani and S. Maneerat. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. **World J. Micro. Biot.** 25: 1337–1345.
- Nakasawa, Y. and A. Hosono. 1992. Functions of fermented milk. **Appl. Sci.** New York.
- Nieto-Lozano, J.C., J.I. Reguera-Useros, C. Peláez-Martínez Mdel and A. Hardisson de la Torre. 2006. Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat. **Meat sci.** 72(1): 57-61.

- _____, _____, _____, G. Sacristán-Pérez-Minayo, A.J. Gutiérrez-Fernández and A. Hardisson de la Torre. 2010. The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. *Food Control*. 21: 679-685.
- Ocana, V.S., A.A. Pesce, H. Ruiz and M.E. Nader-Macias. 1999. Selection of vaginal H₂O₂-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. **Curr. Microbiol.** 38: 279-284.
- Otero M.C. and M.E. Nader-Macías. 2006. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. **Anim Reprod Sci.** 96(1-2): 35-46.
- Ouwehand, A.C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. pp. 139-159. *In* S. Salminen and A. von Wright, eds. **Lactic Acid Bacteria**. MerceL Dekker Inc., New York.
- O'Sullivan, L., R.P. Ross, and C. Hill. 2002. Potential of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria for Improvements in Food Safety and Quality. **Biochimie.** 84(5-6): 593-604.
- Paul, V., G. George, J. Dorothy, R.K. Noel, L. Wolfgang, F.A. Rainey, K.H. Schleifer and B.W. William .2009. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.3.** 2nd ed. Springer Verlag, New York.
- Pridmore, R.D., A.C. Pittet, F. Praplan and C. Cavadini. 2008. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity. **FEMS Microbiol. Lett.** 283(2): 210-215.
- Ponce, A.G., M.R. Moreira, C.E. Valle and S.I. Roura. 2008. Preliminary characterization of bacteriocin-like substances from lactic acid bacteria isolated from organic leafy vegetables. **LWT-Food Sci Technol.** 41: 432-441.

- Price, R.T. and J.S. Lee. 1970. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. **J. Milk Food Technol.** 33: 13-18.
- Raghavendra, P. and M.P. Halami. 2009. Screening, selection and characterization of phytic acid degrading lactic acid bacteria from chicken intestine. **Int. J. Food Microbiol.** 133: 129-134.
- Ravi Sankar, N., V.D. Priyanka, P. Srinivas Reddy, P. Rajanikanth, V.K. Kumar and M. Indira. 2012. Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* isolated from Cow Milk. **Int. J. Microbiol. Res.** 3(2): 133-137.
- Rubin, H.E.. 1978. Toxicology model for a two-acid system. **Appl. Environ. Microbiol.** 36: 623-624.
- Salah, R.B., I. Trabelsi, R.B. Mansour, S. Lassoued, H. Chouayekh and S. Bejar. 2012. A new *Lactobacillus plantarum* strain, TN8, from the gastro intestinal tract of poultry induces high cytokine production. **Anaerobe.** 18: 436-444.
- Salminen, S. and A. von Wright. 1998. Current probiotics-safety assured?. **Microbial Ecol. Health Dis.** 10: 68-77.
- Schillinger, U. and F. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.** 55(8): 1901-1906.
- Schnurer, J. and J. Magnusson. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. **Trends Food Sci Technol.** 16(1-3): 70-78.
- Schoster, A., B. Kokotovic, A. Permin, P.D. Pedersen, F. Dal Bello and L. Guardabassi. 2013. *In vitro* inhibition of *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* by commercial probiotic strains. **Anaerobe.** 20: 36-41.

- Seki, M., K. Iida, M. Saito, H. Nakayama and S. Yoshida. 2004. Hydrogen peroxide production in *Streptococcus pyogenes*: involvement of lactate oxidase and coupling with aerobic utilization of lactate. **J. Bacteriol.** 186(7): 2046-2051.
- Shewmaker, P.L., A.G. Steigerwalt, R.E. Morey, M.G.S. Carvalho, J.A. Elliott, K. Joyce, T.J. Barrett, L.M. Teixeira and R.R. Facklam. 2004. *Vagococcus carniphilus* sp. nov., isolated from ground beef. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 54:1505-1510.
- Shieh, M.J., H. Shang, F.H. Lia, J.S. Zhu and Y.W. Chien. 2011. *Lactobacillus fermentum* improved intestinal bacteria flora by reducing *Clostridium perfringens*. **ESPEN.** 6: 59-63.
- Singh, J. and H. Laxminarayana. 1973. Antibacterial activity of lactobacilli. **Indian J. Dairy Sci.** 26: 135-136.
- Srionnual, S., F. Yanagida, L.H Lin, K.N. Hsiao and Y.S. Chen. 2007. Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, isolated from plaasom, a fermented fish product from Thailand. **Appl. Environ. Microbiol.** 73(7): 2247-2250.
- Stiles, M.E. and W.H. Holzapfel. 1997. lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int. Food Microbiol.** 36: 1-29.
- Sturkie, P.D. 1976. **Avian Physiology.** Springer-Verlag, Berlin.
- Svetoch, E.A., B.V. Eruslanov, V.P. Levchuk, V.V. Perelygin, E.V. Mitsevich, I.P. Mitsevich, J. Stepanshin, I. Dyatlov, B.S. Seal and N.J. Stern. 2011. Isolation of *Lactobacillus salivarius*1077 (NRRL B-50053) and Characterization of its bacteriocin, including the antimicrobial activity spectrum. **Appl. Environ. Microbiol.** 77(8): 2749-2754.

- Tanja, L., E. Malinen, J.M.K. Koort, U. Mertaniemi-Hannus, T. Hankimo, N. Karikoski, S. Pakkanen, H. Laine, H. Sillanpää, H. Söderholm and A. Palva. 2010. Probiotic properties of *Lactobacillus* isolates originating from porcine intestine and feces. **Anaerobe**. 16: 293-300.
- Taylor, W. R.. 1986. Classification of amino acid conservation. **J. Theor. Biol.** 119: 205-218.
- Todorov, S.D. and L.M.T. Dicks. 2006. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria comparison of the bacteriocins. **Process Biochem.** 41: 11–19.
- Uhart, M., S. Ravishankar and N.D.Maks. 2004. Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials on beef franks stored at 4 degrees celcius. **J. Food Prot.** 67(10): 2296-2301.
- Vilà, B., A. Fontgibell, I. Badiola, E. Esteve-Garcia, G. Jiménez, M. Castillo and J. Brufau. 2009. Reduction of *Salmonella enteric* var. enteritidis colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. *toyoi* inclusion in poultry feeds. **Poult Sci.** 88: 975-979.
- Wagner, M. K. and L. J. Moberg. 1989. Present and future use of traditional antimicrobials. **Food Technol.** 43: 143-147.
- Wan Norhana, M.N., S.E. Poole, H.C. Deeth and G.A. Dykes. 2012. Effects of nisin, EDTA and salts of organic acids on *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and native microflora on fresh vacuum packaged shrimps stored at 4 °C. **Food Microbiol.** 31(1): 43-50.
- Willis, W. L., and L. Reid. 2008. Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence. **Poult Sci.** 87: 606-611.

Wood, B.J.B. and W.H. Holzapfel. 1995. **The genera of lactic acid bacteria.** Blackie Academic and Professional, Glasgow.

Zamudio, M., A.Gonzalez and J.A. Medina. 2001. *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. **Lett. Appl. Microbiol.** 32: 181-184.





ภาคผนวก



อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเหลว deMan-Rogosa-Sharpe (MRS: LabM, England)

MRS (DeMan-Rogosa-Sharpe)	55	กรัม
น้ำกลั่น	1	,000 มิลลิลิตร
pH	6.4±0.2	

วิธีเตรียม ชั่งผงอาหารสำเร็จรูป 55 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ใช้ความร้อนช่วยจนละลาย แบ่งเป็นส่วน ๆ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที กรณีที่ต้องการเตรียม MRS ที่มี CaCO_3 ให้เติม CaCO_3 ให้มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์

อาหารเหลว สูตรดัดแปลง MRS-MOPS (Ponnala and Halami, 2009)

Peptone	10	กรัม
Yeast extract	2	กรัม
Meat extract	4	กรัม
Sodium phytate	0.65	กรัม
Glucose	10	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Magnesium sulphate	0.2	กรัม
Manganese sulphate	0.05	กรัม
Tween 80	1.08	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
MOPS (3-[N-Morpholino] propanesulfonic acid)	30	กรัม
น้ำกลั่น	1	,000 มิลลิลิตร
pH	6.4±0.2	

อาหารแข็ง Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC: Oxoid, UK)

Tryptose	15	กรัม
Soya peptone	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Sodium metabisulphite	1	กรัม
Ferric ammonium citrate	1	กรัม
Agar	19	กรัม
D-cycloserine*	400	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
pH	7.6±0.2	

* **วิธีเตรียม** ผสมผงอาหารสำเร็จรูป 47 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ใช้ความร้อนช่วยจนละลาย แบ่งเป็นส่วน ๆ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

สารละลาย cycloserine ละลาย D-cycloserine 1 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรอง และเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ผสมในอาหารก่อนใช้งานทุกครั้งเมื่อต้องการใช้งาน ให้เติมสารละลาย cycloserine ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร 250 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วทดลองงานเพาะเชื้อ เพื่อใช้สำหรับการแยก

Clostridium perfringens

อาหารแข็ง Tryptic Soy Agar (TSA: LabM, England)

Tryptone	17	กรัม
Soy peptone	3	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	,000 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม ผังผงอาหารสำเร็จรูป 30 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ใช้ความร้อนช่วยจนละลาย แบ่งเป็นส่วน ๆ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารแข็ง TSAYE (Teo and Tan, 2005)

Tryptone	17	กรัม
Soy peptone	3	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
Dextrose	2.5	กรัม
Yeast extract	6	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	,000 มิลลิลิตร
pH	7.1±0.2	

วิธีเตรียม ชั่งผงอาหาร TSA สำเร็จรูป 55 กรัม ผสมกับ yeast extract 6 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ใช้ความร้อนช่วยจนละลาย แบ่งเป็นส่วน ๆ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารเหลว Fluid Thioglycolate broth (LabM, England)

Tryptone	15	กรัม
L-Cryptine	0.5	กรัม
Glucose	5.5	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Sodium Chloride	2.5	กรัม
Resazurin	0.001	กรัม
Agar	0.75	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิด ปรับพีเอชให้มีค่าตามต้องการด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



สารเคมี

0.05M Sodium acetate buffer

0.2M Acetate acid	15	มิลลิลิตร
0.2M Sodium acetate	35	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	150	มิลลิลิตร
pH 5.0		

Trichloroacetate acid (TCA) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

Trichloroacetate acid	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

Sodium phytase ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์

Sodium phytase	3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร



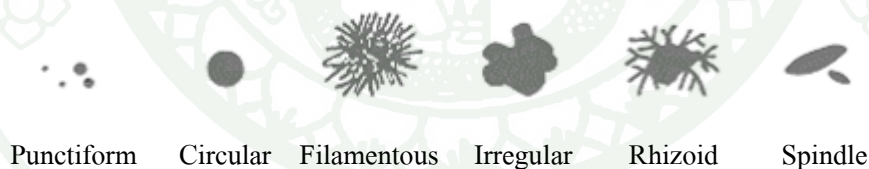
ภาคผนวก ค
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี และเซลล์ของแบคทีเรีย

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี และเซลล์ของแบคทีเรีย

1. สัณฐานวิทยาของโคโลนี (จุลชีววิทยาปฏิบัติการ, 2554)

เมื่อแยกเชื้อ โดยให้เจริญบนอาหารแข็ง ลักษณะการเจริญจะเกิดเป็นโคโลนีของเชื้อ สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า รูปร่างและลักษณะโคโลนีจะมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรีย ลักษณะนี้จึงถูกนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งในการจัดจำแนกเบื้องต้น ซึ่งลักษณะของโคโลนีที่ต้องจดบันทึกเพื่อใช้ในการจัดจำแนก คือ

รูปร่าง (Form)	
Punctiform	จุดกลม เส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 1 มิลลิเมตร
Circular	กลมขอบเรียบ เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร
Filamentous	ลักษณะเป็นเส้นแผ่กระจายออก หรือสานกัน
Irregular	รูปร่างไม่แน่นอน เส้นขอบคดโค้ง
Rhizoid	เส้นขอบไม่เรียบ แดกออกคล้ายรากไม้
Spindle	รูปร่างคล้ายกระสวย มักเกิดอยู่ภายในเนื้ออาหาร



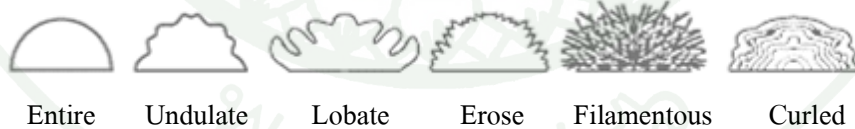
ความสูง (Elevation)

Flat	โคโลนีแบนราบ ไม่มีความสูง
Raised	โคโลนีหนาราบ หรือเป็นชั้น ๆ
Convex	โคโลนีสูง โคนค้ำยกระจกนูน
Pulvinate	โคโลนีโคงค้ำยเบาระองนั้ง
Umbonate	โคโลนีโคงตรงกลางนูนเป็นชั้นที่สอง



ขอบของโคโลนี (Margin)

Entire	ขอบโคโลนีเรียบ
Undulate	ขอบโคโลนีเป็นริ้ว
Lobate	ขอบโคโลนีเป็นร่องลึก
Erose	ขอบโคโลนีคล้ายหนามแหลมยื่นออกไป
Filamentous	ขอบโคโลนีเป็นเส้นยื่นออกไปโดยรอบ
Curled	ขอบโคโลนีเป็นวงริ้วขานรอบโคโลนี



2. การย้อมสีแบบแกรม (Garbutt, 1997)

วิธีปฏิบัติ

1. ทำความสะอาดสไลด์และเช็ดให้แห้ง
2. หยคน้ำกลั่นลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด และป้ายเชื้อบริสุทธิ์ 1 ลูบ สเมียร์ (smear) ให้
เชื้อกระจาย
3. ตรึงเซลล์ให้ติดกับสไลด์โดย นำแผ่นสไลด์ผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง
4. ย้อมสีด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำ
กลั่น
5. หยดสารละลายไอโอดีนเป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง ล้างแผ่นสไลด์
ด้วยน้ำกลั่น พร้อมทั้งหยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ลงไปบนสไลด์ เพื่อชะสีส่วนเกินออกไป ล้าง
แผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น
6. ย้อมสีด้วยสารละลาย safranin O เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง
7. ซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจสอบลักษณะรูปร่างเซลล์และการจัดเรียงตัวด้วย
กล้องจุลทรรศน์

3. การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Garbutt, 1997)

หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนสไลด์ 1 หยด
แล้วใช้ลูบป้ายเชื้อบริสุทธิ์ที่ต้องการทดสอบ สเมียร์ลงบนสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ถ้าพบ
โคโลนีเกิดฟองอากาศ แสดงว่า แบคทีเรียชนิดนั้นให้ผลบวก ส่วน โคโลนีที่ไม่เปลี่ยนแปลงจะให้ผลลบ



ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส (ดัดแปลงมาจากวิธีของ Ullah *et al.*, 1987)

เป็นการวัดปริมาณของสารอนินทรีย์ฟอสเฟตที่ปลดปล่อยออกมาจากซับสเตรตที่ใช้คือ โซเดียมไฟเตต ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์

วิธีการวิเคราะห์

1. ผสมโซเดียมไฟเตต ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กับ acetate buffer pH 5.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร
2. บ่มเป็นเวลา 5 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส
3. เติมสารละลายเอนไซม์ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. หยุดปฏิกิริยาด้วย Trichloroacetic acid 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
5. เติม Developing reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (สารละลายผสมของ ammonium molybdate 3 เปอร์เซ็นต์, H_2SO_4 11 เปอร์เซ็นต์ และ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ในอัตราส่วน 2:2:1 โดยปริมาตร) ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร
6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟต โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานฟอสเฟต

2. การวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟต (Cooper and Helen, 1983)

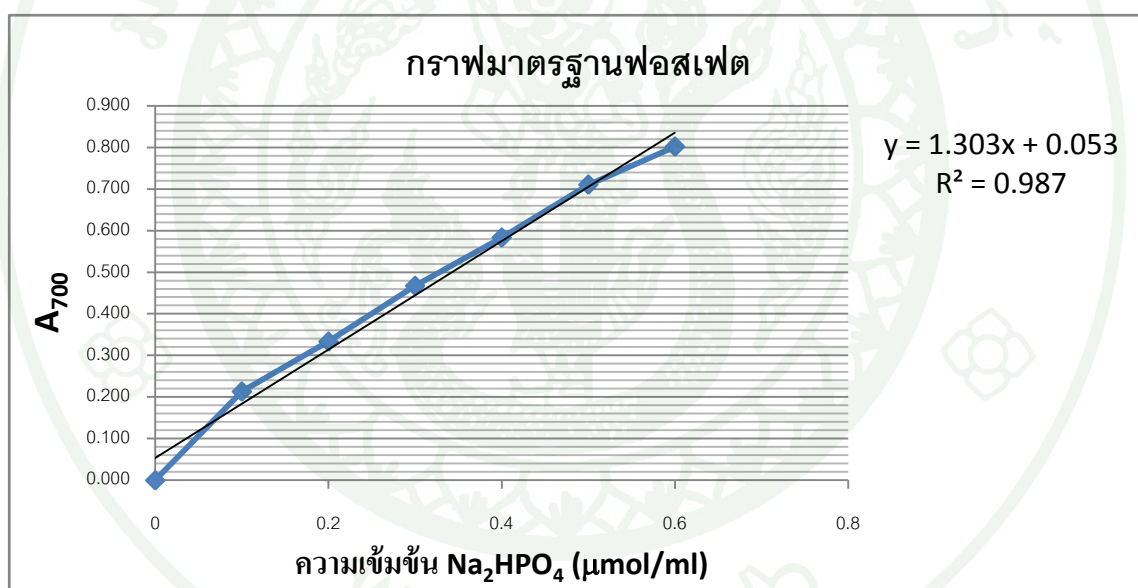
2.1 สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ความเข้มข้น 0-1 ไมโครโมลต่อลิตร

2.2 เติมสารละลายมาตรฐานปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่แห้งและสะอาด

2.3 เติม Developing reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

2.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร และเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณฟอสเฟต

2.5 หาปริมาณฟอสเฟตโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานฟอสเฟต

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวสุกานดา หมุ่มขุง

เกิดวันที่ 15 มิถุนายน 2530

สถานที่เกิด อำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช

ประวัติการศึกษา วท.บ. (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ

สถานที่ทำงานปัจจุบัน -

เอกสารตีพิมพ์ นำเสนอผลงานวิจัยหัวข้อ “Screening for Anti-Pathogenic and Phytate Degrading Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated in Thailand. ในงาน TSB International Forum 2013

ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ -

ทุนการศึกษาที่ได้รับ -