



การแยกเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก
จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก
เพื่อใช้เป็นแหล่งของโปรไบโอติก

- ผศ.วิศัย พรหมเทพ
- สุวภา ยศตระโคตร

การแยกเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เพื่อใช้เป็นแหล่งของโปรไบโอติก

Isolation of Lactic Acid Bacteria from Fermented Food for Probiotic Source

ผศ.วิศิษฐ์ พรหมเทพ¹

สุภา ยศตะโคตร¹

บทคัดย่อ

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกจากอาหารหมัก 6 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร MRS + 1% CaCO_3 ได้เชื้อแบคทีเรียทั้งสิ้น 52 ไอโซเลท โดยศึกษาจากลักษณะรูปร่างและสัณฐานวิทยา เมื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติก พบเชื้อแบคทีเรียตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพที่สุดคือ ไอโซเลท ประตูล 11 โดยสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 3 เปอร์เซ็นต์ ทนต่อสภาวะเป็นกรด pH 2 และมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคปลาได้ โดยสามารถยับยั้งก่อโรค *Aeromonas hydrophila* และเมื่อนำแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก ไอโซเลท ประตูล 11 ไปจัดจำแนกในระดับสกุล พบว่าเป็น *Lactobacillus* sp. ในการศึกษาถึงผลของการเสริม *Lactobacillus* sp. (ประตูล 11) ในปลาตู้ก่อดมรรณภาพด้านการผลิต เช่น น้ำหนักตัวปลาและน้ำหนักรูขี้น้ำ พบว่า การเสริมอาหารด้วย *Lactobacillus* sp. (ประตูล 11) ทำให้สมรรถภาพด้านน้ำหนักตัวปลาและน้ำหนักรูขี้น้ำเพิ่มขึ้น ดังนั้นเพื่อเพิ่มสมรรถภาพการผลิตปลาตู้ให้ดีขึ้นจึงควรเสริมอาหารด้วย *Lactobacillus* sp. (ประตูล 11)

คำสำคัญ : แบคทีเรียสร้างกรดแลคติก, แหล่งโปรไบโอติก

Abstract

Six fermented food samples were collected and used as sources to isolate lactic acid bacteria by using MRS + 1% CaCO_3 medium. 52 isolates obtained were found lactic acid bacteria by studying cell morphology and physiology. Study on certain properties of isolates found only one strain (door I11), which

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร ตำบลธาตุเชิงชุม อำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร 47000

had potential to be used as the probiotic. It was tolerant to 3% bile and showed degrees of survival pH 2 and had antimicrobial activities against *Aeromonas hydrophila*. Based on morphology and biochemical characteristics analysis, door I11 was identified as *Lactobacillus* sp.. The effect of *Lactobacillus* sp. (door I11) on production performance in cat fishs were investigated. The results showed that supplementation of *Lactobacillus* sp. (door I11) in cat fishs diets improved production performance, especially weight gain and live weight efficiency. For optimum performance of cat fishs, *Lactobacillus* sp. (door I11) should be added as supplementation in diets.

Keyword : Lactic acid bacteria, Probiotic source

บทนำ

แบคทีเรียกรดแลคติก หรือ LAB (Lactic Acid Bacteria) มีความสำคัญต่อกระบวนการหมักอาหาร มีประโยชน์ในด้านส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์และสัตว์หรือมีคุณสมบัติเป็น Probiotic เช่น สายพันธุ์เฉพาะของเชื้อ *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* และ *Lb. rhamnosus* สามารถรักษาความผิดปกติในการไม่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตส หรือการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรควิถีทางเดินอาหารที่ทำให้เกิดอาการอุจจาระร่วงในเด็กทารกและอาการระบบทางเดินอาหารอักเสบหรืออาการอุจจาระร่วงในผู้ใหญ่เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังพบว่า *Lb. acidophilus* มีผลต่อการเกิดภาวะการมีคอเลสเตอรอลสูง (hypercholesterol) และยังมีรายงานการวิจัยว่าแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกบางสายพันธุ์มีผลเป็นสารต้านก่อมะเร็ง (antimutagenic) สารต้านเนื้องอก (antitumor) หรือกระตุ้นภูมิคุ้มกันในมนุษย์ และผลเช่นเดียวกันนี้ก็เกิดขึ้นในสัตว์ จากคุณสมบัติข้างต้นของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก การใช้สารเสริมชีวิต (Probiotics) ในอาหารสัตว์เป็นแนวทางหนึ่งสำหรับการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เพราะในปัจจุบันการใช้ยาปฏิชีวนะผสมในอาหารสัตว์นั้นก่อให้เกิดปัญหาามาก เช่น การดื้อยาของสัตว์ สารตกค้างในเนื้อสัตว์ ดังนั้นการเลือกใช้สารเสริมชีวิตในอาหารสัตว์น่าจะเป็นวิธีที่ดีในด้านการใช้ประโยชน์ ส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ที่ปลอดภัย โดยงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ คือแยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักเพื่อใช้เป็นแหล่งของ Probiotic

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. แยกเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักเพื่อใช้เป็นแหล่งของจุลินทรีย์ Probiotic
2. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของจุลินทรีย์โปรไบโอติกของเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่แยกได้
3. ศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติ Probiotic
4. พัฒนาคุณภาพอาหารปลาให้มีคุณภาพเพิ่มมากขึ้นจากจุลินทรีย์ Probiotic

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักเพื่อใช้เป็นแหล่งของจุลินทรีย์ Probiotic นำตัวอย่างละ 25 กรัม ตีปนในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร โดยเครื่องตีปั่นอาหาร ทำการเจือจางตัวอย่าง แล้วเพาะเชื้อด้วยวิธีการ spread plate โดยใช้อาหารเพาะเชื้อ MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีบริเวณใสรอบโคโลนี ทำการขีดเชื้อ (cross streak) บนอาหารเพาะเชื้อ MRS ซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของจุลินทรีย์โปรไบโอติกของเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่แยกได้

2.1 การทดสอบความสามารถทนต่อน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก ดัดแปลงจากวิธีของ Jin *et al.* (1998) โดยถ่ายเชื้อ 1 loop ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเขียนบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1 โคโลนีลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมงแล้วถ่ายเชื้อ 50 ไมโครลิตรลงในอาหารเหลว MRS 5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำดีไก่สด 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และอาหารเหลว MRS ที่ไม่มีน้ำดี 5 มิลลิลิตร เป็นชุดควบคุม บ่มทั้ง 2 ชุดทดลองที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นวัดปริมาณเชื้อที่มีชีวิตด้วยวิธีการ spread plate นำผลที่ได้มาคำนวณหาค่ากิจกรรมการทนต่อน้ำดี

2.2 การทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดและเบส ดัดแปลงมาจากวิธีของ Jin *et al.* (1998) โดยถ่ายเชื้อ 1 loop จาก stock culture ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเขียนบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ 1 โคโลนีลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 50 ไมโครลิตรลงในอาหารเหลว MRS 5 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH 2 โดยใช้ hydrochloric acid ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ในการปรับ MRS ให้เป็นกรด วิเคราะห์ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง และหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง โดยวิธีการ spread plate แสดงผลเป็นค่า เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด

2.3 การทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค โดยวิธี Paper – disc diffusion นำไม้พินสำลีชุบ เชื้อจุลินทรีย์ละลายเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ swab ลงบนอาหารเลี้ยงเพาะเชื้อแข็ง NA + 1 % NaCl และอาหารแข็ง MRS ตามลำดับ จากนั้นนำกระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ชุบเชื้อวางลงบนอาหารแข็ง ทั้งสอง แล้วหยดน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่ผ่านการปรับ pH ให้เป็นกลาง (pH 7) ปริมาณ 20 ไมโครลิตรลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยคำนวณประสิทธิภาพการยับยั้งเป็นกิจกรรมการยับยั้ง (inhibition activity)

3. การจัดจำแนกในระดับจิ้นส์ แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่สร้างแบคทีเรียโอซินได้ ดัดแปลงมาจากวิธี Beisheier *et al.* (1991)

3.1 การดัดสีแกรม รูปร่างและการสร้างก๊าซเมื่อเจริญในอาหาร MRS broth

3.2 การเจริญในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 10 และ 45°C

3.3 การเจริญในอาหาร MRS broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 6.5 และ 18 %

3.4 การเจริญในอาหาร MRS broth ที่ปรับค่า pH เป็น 4.4 และ 9.6

4. การพัฒนาคุณภาพอาหารปลาเพื่อให้ปลามีคุณภาพเพิ่มมากขึ้นจากจุลินทรีย์ Probiotic ในการทดลองได้วางแผนการทดลองแบบสุ่มทดลอง ซึ่งแบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่มตามสูตรอาหาร โดยใช้ลูกปลาดุกอายุเริ่มทดลอง 1 เดือน กลุ่มการทดลองละ 15 ตัว รวมทั้งหมด 30 ตัว ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 40 วัน ซึ่งมีการแบ่งกลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ให้อาหารพื้นฐานไม่เสริมโปรไบโอติก

กลุ่มที่ 2 ให้อาหารพื้นฐานเสริมโปรไบโอติกรหัสประจำตัว I11

ทำการเลี้ยงปลาดุกเป็นเวลา 20 วัน จากนั้นใส่เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปริมาณเชื้อละ 10^8 CFU/ml ลงในบ่อเลี้ยงปลาทั้ง 2 กลุ่ม จากนั้นเลี้ยงปลาจนครบ 40 วัน จากนั้นบันทึกและวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิจัย

1. ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักเพื่อใช้เป็นแหล่งของจุลินทรีย์ Probiotic

ผลการคัดแยกแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักต่างๆ คือ ปลาร้า แหนมกุ้ง จ่อม ส้มตำวุ้น และหน่อไม้ดอง ด้วยเทคนิค spread plate บนอาหาร MRS ที่เติม CaCO_3 ร้อยละ 1 นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) จากนั้นเลือกแบคทีเรียที่มีบริเวณใสรอบโคโลนีไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak บนอาหาร MRS จากการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกได้ทั้งหมด 52 ไอโซเลต

2. ผลการศึกษาคุณสมบัติบางประการของจุลินทรีย์โปรไบโอติกของเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่แยกได้

2.1 ผลการทดสอบความสามารถทนต่อน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก การแยกแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก จำนวน 52 ไอโซเลต ที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติกในเบื้องต้นเป็นการคัดเลือกจากความสามารถในการทนต่อน้ำดี เนื่องจากน้ำดีเป็นสารช่วยย่อยสารอาหารประเภทไขมันในลำไส้เล็กของสัตว์ มีคุณสมบัติทำให้ไขมันแตกตัวย่อยสารอาหารประเภทไขมันในลำไส้เล็กของสัตว์ (Eugene *et al.*, 1996) จึงสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียตายได้ (Jin *et al.*, 1998) ดังนั้น ความสามารถในการทนต่อน้ำดีจึงเป็น

ปัจจัยสำคัญในการคัดเลือกเชื้อที่จะนำไปผลิตโปรไบโอติก จากการทดสอบความสามารถทนต่อน้ำดีของ แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกจำนวน 52 ไอโซเลต ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำดีเท่ากับ 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียสร้างกรดแลคติก 26 ไอโซเลต มีความสามารถทนต่อน้ำดีได้ ได้แก่ ไอโซเลต ปลาร้า 13, ปลาร้า 14, ปลาร้า 15, ปลาร้า 10, ส้มเท้าวัว 1, ส้มเท้าวัว 3, กุ้ง 1, กุ้ง 5, กุ้ง 7, กกล 1, กกล 2, วร 1, วร 2, วร 4, วร 5, วร 6, วร 7, วร 8, ประดู่ 2, ประดู่ 4, ประดู่ 9, ประดู่ 11, ประดู่ 12, ประดู่ 14, ประดู่ 15 และ ประดู่ 16 ซึ่งเชื้อ แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกทั้ง 26 ไอโซเลต น่าจะมีประโยชน์ต่อการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดิน อาหารได้ เนื่องจากจุลินทรีย์ทั้ง 26 ไอโซเลต สามารถทนต่อสภาวะกดดันที่มีเกลือในลำไส้เล็กที่ถูกส่งมาจาก น้ำดีในตับในรูปของ conjugate bile acid เกลือน้ำดีจะถูกหมุนเวียน 10 – 12 ครั้งต่อวัน เพื่อทำปฏิกิริยากับอาหารประเภทไขมันและโคเลสเตอรอล หลังจากนั้นจะถูกดูดซึมผ่านเส้นเลือดดำไปยังตับเพื่อแปรรูปและ หมุนเวียนนำกลับมาใหม่ซึ่งเรียกว่า deconjugated bile acid ดังนั้นการเกิดกระบวนการดังกล่าวจึงมีบทบาท สำคัญในการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบลำไส้ และการศึกษาคุณสมบัติการทนต่อ น้ำดี แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียสามารถที่จะทนอยู่ได้ในลำไส้ เนื่องจากน้ำดีมีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียได้ นอกจากนั้นน้ำดี ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยการย่อยสลายไขมันและกรดไขมันต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ เกิดเป็นช่องว่างทำให้ความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร (permeability) สูญหายไป (Jin et al. 1998)

2.2 ผลการทดสอบความสามารถในการทนต่อกรด ความสามารถในการทนต่อกรดเป็นคุณสมบัติ ของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก (Havenaar et al. 1992) เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของคน และสัตว์ มีการหลั่งกรดเกลือทำให้ pH ในระบบทางเดินอาหารลดลงเท่ากับ 0.5 – 2.0 ส่งผลต่อแบคทีเรียส่วนใหญ่ทำให้ไม่สามารถทนและเจริญได้ (Jin et al. 1998) ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้นำแบคทีเรียสร้างกรด แลคติกที่สามารถทนต่อ น้ำดี จำนวน 26 ไอโซเลต มาคัดเลือกแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่สามารถทนต่อกรด เพื่อสามารถเจริญและอยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เจ้าถิ่น และจากการทดลองพบว่า เชื้อ แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกไอโซเลตที่ทนต่อ pH 2 มีทั้งหมด 10 ไอโซเลตคือ วร 5, ปลาร้า 15, ส้มเท้าวัว 1, กุ้ง 1, กกล 2, ประดู่ 4, ประดู่ 9, ประดู่ 11, ประดู่ 12 และ ประดู่ 16

2.3 ผลการทดสอบความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค การศึกษาความสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค เนื่องจาก แบคทีเรียโปรไบโอติกมีความสามารถในการส่งเสริมให้สัตว์เจ้าบ้านมีสุขภาพที่ดี การยับยั้งเชื้อก่อ โรคจึงเป็นปัจจัยหน้าที่สำคัญในการคัดเลือกแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก ทำโดยนำเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแล คติกที่ผ่านคุณสมบัติการเจริญเติบโตได้ในกรด pH 2 จำนวน 10 ไอโซเลต มาศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้ง จุลินทรีย์ที่มักเป็นสาเหตุการเกิดโรคในปลา 2 ชนิด คือ *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus* sp. โดยวิธี paper – disc diffusion ถ้าเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกสามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้จะพบ บริเวณใสเกิดในขอบแผ่น disc ทดสอบโดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกมาทดสอบ พบว่า มีเพียง

7 ไอโซเลตเท่านั้นที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ได้คือ ปลาบ้า15, ส้มตันวัว1, ประตูล4, ประตูล9, ประตูล11, ประตูล12, และประตูล16 โดยไอโซเลตที่ยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุด คือ ประตูล11 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 1 เซนติเมตร จากผลการทดลองยังพบอีกว่าลักษณะของบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบ disc ยังใสและชัดเจนกว่าไอโซเลตอื่นๆ ดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 บริเวณใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสร้าง กรดแลคติก ไอโซเลตประตูล 11

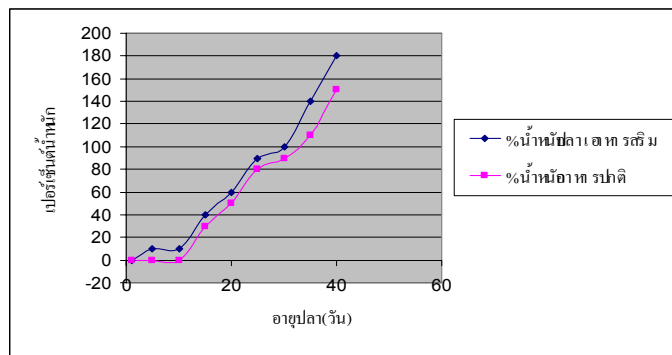
3. ผลการศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติ probiotic

นำแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกไอโซเลตประตูล 11 ศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมี โดยนำข้อมูลที่ได้มาเทียบกับข้อมูล Bergey 's Manual of Systemic Bacteriology (Sneath. 1986) วิธีการของนิดา อาบสุวรรณ (2550 อ้างถึง Salmiminen & Wright.1993) พบว่าเชื้อไอโซเลตประตูล 11 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น ไม่สร้างเอนไซม์อะตเลส สร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส เป็นแบคทีเรียที่หมักแบบ Homofermentative ไม่เจริญในอาหารที่มีเกลือร้อยละ 6.5 และ 18 เจริญได้ที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ที่ pH 4.4 แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ pH 9.6 และไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ พบว่า เป็นแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกในสกุล *Lactobacillus* sp.

4. การพัฒนาคุณภาพอาหารปลาให้ปลามีคุณภาพเพิ่มมากขึ้นจากจุลินทรีย์ Probiotic

ในการทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มทดลอง ซึ่งแบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่มตามสูตรอาหาร โดยใช้ลูกปลาดุกอายุเริ่มทดลอง 1 เดือน กลุ่มการทดลองละ 15 ตัว รวมทั้งหมด 30 ตัว ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 40 วัน มีการแบ่งกลุ่มการทดลองดังนี้ กลุ่มที่ 1 เลี้ยงด้วยอาหารพื้นฐานไม่เสริมโปรไบโอติก และกลุ่มที่ 2 เลี้ยงด้วยอาหารพื้นฐานเสริมโปรไบโอติกรหัสประตูล 11 เลี้ยงปลาดุกเป็นเวลา 20 วัน จากนั้นใส่เชื้อแบคทีเรียก่อโรคปลา คือ *Aeromonas hydrophila* ในปริมาณเชื้อละ 10^8 CFU/ml ลงในบ่อเลี้ยงปลาทั้ง 2 กลุ่ม

จากนั้นเลี้ยงปลาจนครบ 40 วัน พบว่าปลาในบ่อซีเมนต์ที่ให้อาหารผสมเชื้อโปรไบโอติกรหัสประตู่ 11 เจริญเติบโตได้ดีกว่าปลาที่ไม่ได้รับเชื้อโปรไบโอติก ซึ่งเห็นได้จากเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเฉลี่ย ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 เปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นของน้ำหนักเฉลี่ยของปลา

หลังจากนั้นจึงผสมเชื้อก่อโรคปลา *Aeromonas hydrophila* ในปริมาณเชื้อละ 10^8 CFU/ml ลงในบ่อเลี้ยงปลาทั้ง 2 กลุ่ม ทำการเลี้ยงปลาต่อไปด้วยอาหารที่ผสมและไม่ผสมเชื้อโปรไบโอติกดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นเป็นเวลาอีก 20 วัน โดยในแต่ละวัน เผ้าสังเกตและบันทึกอาการป่วยและตายของปลาในแต่ละบ่อ พบว่าปลาที่ให้อาหารผสมเชื้อเสริมโปรไบโอติกรหัสประตู่ 11 เติบโตได้ตามปกติ ลักษณะของตัวปลาเป็นปกติและไม่เกิดบาดแผลบริเวณผิวหนัง ในขณะที่ปลาที่ให้อาหารปกติเริ่มแสดงอาการป่วย ผิวหนังของปลาเกิดบาดแผลทุกตัว และตายจนเหลือรอดชีวิตเพียง 10 ตัว

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การคัดเลือกแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่แยกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ซึ่งมีคุณสมบัติของโปรไบโอติกพบว่า แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่แยกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักคือ ปลา ร้า แหนม กุ้งจ่อม ส้มเท้าวัว และหน่อไม้ดอง สามารถแยกได้เชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกทั้งหมด 52 ไอโซเลต ซึ่งเลือกจากโคไลนีเดียวๆ ที่มีบริเวณไฮรอปโคไลนินบนอาหาร MRS ที่เติม CaCO_3 และมีเพียง 26 ไอโซเลตเท่านั้นที่สามารถทนต่อกรด ความเข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ได้ ได้แก่ ไอโซเลต ปลา ร้า 3 ปลา ร้า 4 ปลา ร้า 5 ปลา ร้า 10 ส้มเท้าวัว 1 ส้มเท้าวัว 13 กุ้ง 1 กุ้ง 5 กุ้ง 7 กก 1 กก 2 วร 1 วร 2 วร 4 วร 5 วร 6 วร 7 วร 8 ประตู่ 2 ประตู่ 4 ประตู่ 9 ประตู่ 11 ประตู่ 12 ประตู่ 14 ประตู่ 15 และประตู่ 16 ซึ่งเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกทั้ง 26 ไอโซเลตน่าจะจะมีประโยชน์ต่อการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารได้ เนื่องจากจุลินทรีย์ทั้ง 26 ไอโซเลต สามารถทนต่อสภาวะกดดันที่มีเกลือในน้ำได้ในลำไส้เล็กที่ถูกส่งมาจากถุงน้ำดีในตับในรูปของ conjugate bile acid เกลือน้ำดีจะ

ถูกหมวนเวียน 10 – 12 ครั้งต่อวัน เพื่อทำปฏิกิริยากับอาหารประเภทไขมันและโคเลสเตอรอล หลังจากนั้นจะถูกดูดซึมผ่านเส้นเลือดดำไปยังตับเพื่อแปรรูปและหมวนเวียนนำกลับมาใหม่ซึ่งเรียกว่า deconjugated bile acid ดังนั้นการเกิดกระบวนการดังกล่าวจึงมีบทบาทสำคัญในการรักษาสสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบลำไส้ จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกทั้ง 26 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการทนต่อกรด pH 2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อทดสอบความสามารถในการเจริญและอยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เจ้าถิ่น จากการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกไอโซเลตที่ทนต่อ pH 2 มีทั้งหมด 10 ไอโซเลต คือ ร15 ปลาร้า15 ส้มเท้าวัว1 กุ้ง1 กก12 ประตุ4 ประตุ9 ประตุ11 ประตุ12 และประตุ16

การศึกษาศักยภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรค เนื่องจากแบคทีเรียโปรไบโอติกมีความสามารถในการส่งเสริมให้สัตว์เจ้าบ้านมีสุขภาพที่ดี การยับยั้งเชื้อก่อโรคจึงเป็นปัจจัยหน้าที่สำคัญในการคัดเลือกแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก ทำโดยนำเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกที่ผ่านคุณสมบัติการเจริญเติบโตได้ในกรด pH 2 จำนวน 10 ไอโซเลต มาศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ที่มักเป็นสาเหตุการเกิดโรคในปลา 2 ชนิด คือ *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus* sp. โดยวิธี paper – disc diffusion assay ถ้าเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกสามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ จะมีบริเวณใสเกิดในขอบแผ่น disc ทำโดยนำน้ำเลี้ยงปราศจากเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกมาทดสอบ พบว่า มีเพียง 7 ไอโซเลตเท่านั้นที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค *Aeromonas hydrophila* ได้คือ ปลาร้า15 ส้มตีนวัว1 ประตุ4 ประตุ9 ประตุ11 ประตุ12 และประตุ16 โดยไอโซเลตที่ยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดคือ ประตุ11 จากนั้นศึกษาอนุกรมวิธานเพื่อจำแนกสกุลของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก ไอโซเลต ประตุ11 พบว่า อยู่ในสกุล *Lactobacillus* sp. แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้

การพัฒนาคุณภาพอาหารปลาให้ปลามีคุณภาพเพิ่มมากขึ้นจากจุลินทรีย์ Probiotic ทำโดยนำลูกปลาดุกอายุเริ่มทดลอง 1 เดือน กลุ่มการทดลองละ 15 ตัว รวมทั้งหมด 30 ตัว ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 40 วัน ซึ่งมีการแบ่งกลุ่มการทดลองดังนี้ กลุ่มที่ 1 ให้อาหารพื้นฐานไม่เสริมโปรไบโอติก และกลุ่มที่ 2 ให้อาหารพื้นฐานเสริมโปรไบโอติก 11 ตัว ทำการเลี้ยงปลาทุกเป็นเวลา 20 วัน จากนั้นใส่เชื้อแบคทีเรียก่อโรคปลา คือ *Aeromonas hydrophila* ในปริมาณเชื้อละ 10^5 CFU/ml ลงในบ่อเลี้ยงปลาทั้ง 2 กลุ่ม จากนั้นเลี้ยงปลาจนครบ 40 วัน ซึ่งพบว่าปลาในบ่อซีเมนต์ที่ให้อาหารผสมเชื้อโปรไบโอติก 11 เจริญเติบโตได้ดีกว่าปลาที่ไม่ได้รับเชื้อโปรไบโอติก เห็นได้จากเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเฉลี่ย และเมื่อผสมเชื้อก่อโรคปลา *Aeromonas hydrophila* ลงในบ่อเลี้ยงปลาทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าปลาที่ให้อาหารผสมเชื้อเสริมโปรไบโอติก 11 เติบโตได้ตามปกติ ลักษณะของตัวปลาเป็นปกติและไม่เกิดโรคแผลตามลำตัว (Ulcerative disease) ในขณะที่ปลาที่ให้อาหารปกติ เริ่มแสดงอาการป่วย คือ ในระยะแรกผิวหนังของปลามีสีแดงและจะเริ่มเปื่อยเป็นแผลและสึกจนเห็นกล้ามเนื้อและตายในที่สุดเหลือรอดชีวิตเพียง 10 ตัว ผลการวิจัยดังกล่าว เนื่องมาจากโปรไบโอติกสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ด้วยกลไกสำคัญ 2 ประการ คือ การแย่งพื้นที่ในการยึดติด (competitive adhesion site) กับเยื่อเมือกผนังลำไส้ (intestinal mucosa) และการแย่งสารอาหาร แบคทีเรียโปร

ไบโอติกเจริญครอบคลุมผิวเยื่อบุผนังลำไส้ ซึ่งป้องกันไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ นอกจากนั้นแบคทีเรียโปรไบโอติกยังสามารถสร้างสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย (anti – bacteria compounds) ได้แก่ กรดอินทรีย์ (organic acid) แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (Franz *et al.* 1998) เป็นต้น

เชื้อโปรไบโอติกที่สเปรต 11 ที่แยกได้นี้ไม่เพียงแต่จะช่วยป้องกันปลาจากที่ใช้ทดสอบจากการติดเชื้อก่อโรคเท่านั้น แต่ยังช่วยส่งเสริมการเจริญของลูกปลาดังจะเห็นได้จากน้ำหนักเฉลี่ยของลูกปลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดเนื่องมาจากเชื้อโปรไบโอติกที่สเปรต 11 ดังกล่าวนั้นมีคุณสมบัติการทนต่อน้ำดี เพราะน้ำดีมีคุณสมบัติในการย่อยสลายไขมันและกรดไขมันต่างๆ ให้มีโมเลกุลเล็กลง สามารถนำสารต่างๆ เข้าไปใช้ประโยชน์ภายในเซลล์ได้ดี และเพิ่มขึ้น (Jin *et al.* 1998) ดังนั้นเชื้อโปรไบโอติกที่สเปรต 11 จึงมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมของปลาคูต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษานี้เป็นการศึกษาการจัดจำแนกเพียงในระดับชั้นสกุลเท่านั้น ทำให้ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นสายพันธุ์อะไร ดังนั้นในการศึกษารั้งต่อไปควรศึกษาในระดับสายพันธุ์ เพื่อจะได้ทราบว่า แบคทีเรียสร้างกรดแลคติกดังกล่าว เป็นแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกสายพันธุ์ใหม่หรือไม่

เอกสารอ้างอิง

- Beisheir, L. (1991). **Microbiology in Practice**. 5th ed. New York: Harper Collins publisher, Inc.
- Eugene, B.C., Sitrin M.D. and Black, D.D. (1996). **Gastrointestinal Hepatobiliary and Nutritional Physiology**. Pennsylvania :Lippincott–Raven Publishers.
- Franz, C.M.A.P., Toit, D.M. and Olasupo, U. Schillinger and Holzapfel, W.H. (1998). Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BEF 905 from ready-to eat salad. **Letters in Applied Microbiology**. 76: 231–235.
- Havenaar, R., and J.H.J. Huis in't Veid. (1992). **Probiotic and Lactic Acid Bacteria in Health and Disease**. London : Elsevier.
- Jin, L.Z., Ho, M.Y., Abdullah, N. Ali, A.M. and Jalaludin, S. (1998). Acid and bile tolerance of *lactobacillus* isolated from chicken intestine. **Applied Microbiology**. 27: 183–185.
- Salminen, S., A. Von Wright. (1993). **Lactic Acid Bacteria**. New York :Marcel Dekkel.
- Sneath, P.H.A. (1986). **Bergey's Manual of Systemic Bacteriology Vol.2**. Baltimore :William and Wilkins.