View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Srinakharinwirot University: SWU e-Journals System

บทความวิจัย

การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากมูลไก่พันธุ์พื้นเมือง

จิระประภา ตุยารัมย์[1], อนุสรา มีบุญลาภ[2], กำชัย ตันติกาพงศ์[3] และ มณฑล เลิศวรปรีชา[4*]

ได้รับบทความ: 8 เมษายน 2562
ได้รับบทความแก้ไข: 14 กรกฎาคม 2562
ยอมรับตีพิมพ์: 22 กรกฎาคม 2562

บทคัดย่อ

การใช้ยาปฏิชีวนะสำหรับเลี้ยงไก่เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายอย่างต่อเนื่องในระยะยาว ส่งผลกระทบทางลบโดยทำให้เกิดแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ ดังนั้นทางเลือกในการลดผลกระทบของแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะแต่ยังสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์พร้อมทั้งยังป้องกันโรคได้คือการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพต่อการป้องกันการก่อโรคในลำไส้ และช่วยส่งเสริมระบบย่อยอาหารของไก่ แบคทีเรียหลายชนิดมีคุณบัติเป็นโพรไบโอติก แต่แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีศักยภาพมากที่สุดสำหรับใช้เป็นโพรไบโอติกเสริมในอาหารสัตว์ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากมูลไก่พันธุ์พื้นเมือง จากตัวอย่างมูลไก่พันธุ์พื้นเมือง 27 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 171 ไอโซเลท จากการศึกษาคุณสมบัติของโพรไบโอติก ได้แก่ ความสามารถต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ความสามารถทนต่อเกลือน้ำดี ความสามารถทนกรด และคุณสมบัติ hydrophobicity พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 6 ไอโซเลท จากทั้งหมด 171 มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับเป็นโพรไบโอติก ผลการจัดจำแนกโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าทั้ง 6 ไอโซเลท เป็นเชื้อ *Enterococcus faecium, Lactobacillus plantarum* และ *L. salivarius* ผลการศึกษานี้สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติของโพรไบโอติกที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นโพรไบโอติกสำหรับสัตว์ปีกต่อไป

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติก, โพรไบโอติก, ไก่พันธุ์พื้นเมือง

[1]สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขต พัทลุง 93210
[2]สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขต พัทลุง 93210
[3]สาขาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขต พัทลุง 93210
[4*]สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขต พัทลุง 93210
[*]ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: worapreecha@gmail.com

Isolation and Characterization of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Native Chicken Manure

Chiraprapha Tuyarum[1], Anusara Meeboonlab[2], Kumchai Tontikapong[3] and Monthon Lertworapreecha[4*]

Received: 8 April 2019
Revised: 14 July 2019
Accepted: 22 July 2019

ABSTRACT

The long-term continuous using of antibiotics as a growth promoter in chicken has a negative impact on emerging of antibiotics resistance bacteria. Therefore, an alternative way to reduce the effects of antibiotics resistant bacteria, but still promote the growth of chicken together with an efficiently prevention of disease is using of an effective probiotics microorganisms. Many microorganisms have been using as probiotics, but lactic acid bacteria (LAB) seem to be the potential probiotic agent in chicken feed. Therefore, the objectives of this study are to isolate, identify and characterize the probiotic properties of LAB isolated from the native chicken manure. The LAB was isolated from the manure of 27 native chickens. This study found that 171 LAB were isolated from samples of native chicken manure. The probiotic properties, such as the antibacterial activity against pathogenic bacteria, bile salt tolerance, acid tolerance and hydrophobicity were determined in all the 171 isolates. The results showed that of total 171 isolates, 6 isolates that showed the satisfactory results of probiotic properties. The 16s rRNA gene sequencing analysis indicated that were *Enterococcus faecium,* Lactobacillus *plantarum* and *L. salivarius.* Throughout this study, we able to isolate 6 LAB from chicken manure and demonstrate their probiotic properties that suitable for further development of probiotics for poultry.

Keywords: Lactic Acid Bacteria, Probiotics, Native Chicken Manure

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung, 93210, Thailand
[2]Department of Biology, Microbiology, Faculty of Science, Thaksin University
[3]Department of Animal Production Technology, Faculty of Technology and Community Development, Thaksin University.
[4*]Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Phatthalung 93210, Thailand.
[*]Corresponding author, e-mail : worapreecha@gmail.com

บทนำ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกขยายตัวอย่างรวดเร็ว เนื่องจากความต้องการบริโภคที่สูงมากขึ้น ข้อมูลในปี 2560 ประเทศไทยมีการผลิตไก่เนื้อเพื่อการบริโภคและการส่งออกประมาณ 0.67 ล้านตัน ดังนั้นเกษตรกรผู้ผลิตสัตว์ปีกจึงมีการปรับตัวโดยมีการปรับปรุงการผลิตในด้านต่างๆ ตั้งแต่การพัฒนาสายพันธุ์ การพัฒนาอาหารสัตว์และการจัดการฟาร์ม ทั้งนี้เพื่อให้กระบวนการผลิตมีประสิทธิภาพทั้งทางด้านปริมาณและคุณภาพ ทันต่อความต้องการบริโภคที่เพิ่มขึ้น การใช้วัตถุเสริมอาหาร เช่น สารเคมี สารกันหืน สารกันเชื้อราและยาปฏิชีวนะจึงถูกใช้เป็นทางเลือกสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะการใช้ยาปฏิชีวนะเสริมในอาหารสัตว์เพื่อป้องกันหรือรักษาโรค และเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ ส่งผลให้ยาปฏิชีวนะตกค้างในระดับต่ำเป็นระยะเวลานาน ซึ่งการใช้อย่างต่อเนื่องนี้อาจส่งผลให้แบคทีเรียก่อโรคในสัตว์เกิดการดื้อยาปฏิชีวนะ และอาจแพร่กระจายในปศุสัตว์หรือติดต่อไปยังมนุษย์ [1] กระบวนการผลิตสัตว์ในหลายประเทศจึงหันมาให้ความสำคัญในการวิจัยเพื่อหาแนวทางทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ แนวทางหนึ่งที่นักวิจัยให้ความสนใจพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อทดแทนการใช้ยาต้านจุลชีพกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์ คือ การใช้แบคทีเรียโพรไบโอติก (probiotics) โดยอาศัยความรู้พื้นของการแข่งขันระหว่างแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียโพรไบโอติกจะแย่งยึดเกาะบริเวณลำไส้ ทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถเกาะผนังลำไส้และถูกขับออกผ่านทางอุจจาระไป [2] จุลินทรีย์โพรไบโอติก นี้อาจเป็นกลุ่มของแบคทีเรียหรือเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดี่ยวๆที่สามารถเจริญได้ปกติในทางเดินอาหารของเจ้าบ้านสามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมในระบบทางเดินอาหาร เช่น สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร การทดต่อเกลือน้ำดีภายในลำไส้ แบคทีเรียที่จัดเป็นโพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria: LAB) เช่น *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Pediococcus* spp. และ *Bifidobactrium* spp. [3] แม้ว่าโพรไบโอติกจะไม่ใช่แนวทางเลือกใหม่สำหรับการเลี้ยงสัตว์ แต่การศึกษาโพรไบโอติกสำหรับสัตว์ที่ผ่านมามุ่งเน้นแบคทีเรียโพรไบโอติกสายพันธุ์เดี่ยวๆ และสายพันธุ์แบคทีเรียที่นำมาใช้ในสัตว์สปีชีส์หนึ่งอาจจะไม่ใช่แบคทีเรียที่แยกได้จากสัตว์สปีชีส์เดียวกัน ดังนั้นจึงอาจจะเป็นจุดอ่อนที่ทำให้แบคทีเรียโพรไบโอติกที่ใช้ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ปัจจุบันมีข้อมูลยืนยันว่าการเลือกใช้โพรไบโอติกที่แยกได้จากสัตว์สปีชีส์ใดจะมีประสิทธิภาพในการยึดเกาะหรืออาศัย (colonize) ได้ในสัตว์สปีชีส์นั้นอย่างมีประสิทธิภาพ [4, 5] คุณสมบัติของแบคทีเรียแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ การคัดเลือกเพื่อให้ได้ความหลากหลายของสายพันธุ์จึงมีความสำคัญ การศึกษาและค้นหาเชื้อแบคทีเรียที่ดีมีประโยชน์โดยเฉพาะการคัดแยกสายพันธุ์จากเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของไก่พันธุ์พื้นเมืองที่เลี้ยงปล่อยแบบธรรมชาติโดยไม่เคยได้รับอาหารที่ผสมยาต้านจุลชีพ สำหรับในประเทศไทยนั้นยังมีการศึกษาน้อยมาก ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและทดสอบหาความสามารถของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลของไก่พันธุ์พื้นเมืองที่มีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับการเป็นโพรไบโอติก โดยคาดหวังว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกที่แยกได้จากไก่ดังกล่าวจะเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์สามารถนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในไก่ได้อย่างเหมาะสม

อุปกรณ์และวิธีทดลอง

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก จากมูลสัตว์ปีก

เก็บตัวอย่างมูลไก่พันธุ์พื้นเมืองที่เลี้ยงปล่อยแบบธรรมชาติจากเกษตรกรโดยนำมาเจือจางใน 0.85% normal saline ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นดูด 0.1 mL มาเลี้ยงในอาหาร MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) agar ที่เติม 0.01% bromocresol purple เพื่อคัดแยกเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่สามารถสร้างกรดโดยสังเกตสีของอาหารที่เปลี่ยนแปลงไปและคัดแยกเชื้อ *Enterococcus* sp. ด้วยอาหาร KF (Kenner Fecal) streptococcal agar ที่เติม 0.01% bromocresol purple และ 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีสีเหลืองรอบๆ โคโลนี นำมาเลี้ยงในอาหาร MRS agar ที่เติม 0.01% bromocresol purple เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ และทดสอบลักษณะเบื้องต้นโดยการศึกษาลักษณะของเซลล์การย้อมติดสีแกรมและการสร้างเอนไซม์ catalase

การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

ศึกษาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยใช้วิธี agar diffusion test โดยนำแบคทีเรียที่แยกได้ เลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง แล้วปรับปริมาณของเชื้อให้ได้ 10^6 CFU/mL และนำแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งได้แก่ Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *S. Typhimurium* (isolated strain) และ *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) เลี้ยงในอาหาร NA (Nutrient agar) ปรับเชื้อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland number 0.5 ด้วยเครื่อง densitometer (Biosan: England) แล้วใช้ไม้พันสำลีกวาดเชื้อลงบนอาหารแข็ง NA ให้ทั่วจานเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.5 mm และหยดแบคทีเรียกรดแลคติกปริมาตร 200 µL/well นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 24 ชั่วโมง และวัดขนาดวงใส [6]

การทดสอบความสามารถในการทนกรด

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 24 ชั่วโมง แล้วปรับเชื้อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland number 0.5 จะมีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^8 CFU/mL จากนั้นถ่ายเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติก 100 µL ลงใน MRS broth 900 µL ที่ปรับค่า pH เท่ากับ 2.0 และ 3.0 (1M HCl) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ที่เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง นำมาเกลี่ย (spread) ลงใน MRS agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 24 ชั่วโมง และนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต นำผลที่ได้มาคำนวณอัตราการรอดชีวิตโดยใช้สมการดังนี้ [7]

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต = $(N_1/N_0) \times 100$

N_0 คือ ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น

N_1 คือ ปริมาณแบคทีเรียรอดชีวิต

การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี

เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกใน MRS agar เวลา 24 ชั่วโมง นำมาปรับจำนวนเซลล์ประมาณ 10^8 CFU/mL จากนั้นถ่ายเซลล์ปริมาตร 100 µL ลงในอาหาร MRS broth 900 µL ที่มี 0.3% และ 1.0% ox gall นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 0 และ 3 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตโดยการนำไปเจือจางด้วย 0.85% normal saline ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และนำมาเกลี่ยในอาหาร MRS agar ที่เติม 0.01% bromocresol purple บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 24-48 ชั่วโมง และนำผลที่ได้มาคำนวณอัตราการรอดชีวิตของเชื้อ [7]

การทดสอบคุณสมบัติ hydrophobicity

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ที่แยกได้มาศึกษาความมีขั้วและไม่มีขั้ว ซึ่งเป็นการศึกษาทางอ้อมสำหรับคุณสมบัติการยึดเกาะติดลำไส้ โดยปรับความขุ่นแบคทีเรียกรดแลคติกให้เท่ากับ McFarland number 0.5 แล้ว แบ่งใส่ cuvette ปริมาตร 4 mL แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 640 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ซึ่งกำหนดค่าให้เป็น A1 และแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติก 3.5 mL ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติม hexadecane 0.5 mL จากนั้นนำไปเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 2 นาที และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10-15 นาที จะเกิดการแยกชั้นและนำส่วนของเหลวที่อยู่ด้านล่างมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 640 nm (OD_{640}) ซึ่งกำหนดค่าให้เป็น A2 คำนวณเปอร์เซนต์ Hydrophobicity Index (HPBI) ดังนี้

$$HPBI = [(A1-A2)/A1] \times 100$$

เชื้อไอโซเลทใดที่มี HPBI มากกว่าร้อยละ 70 จัดเป็นประเภทไม่ชอบน้ำมาก (high hydrophobicity) ไอโซเลทใดที่มี HPBI ระหว่างร้อยละ 50-70 จัดเป็นประเภทไม่ชอบน้ำปานกลาง (moderate hydrophobicity) และไอโซเลทใดที่มี HPBI ต่ำกว่าร้อยละ 50 ถูกจัดเป็นประเภทไม่ชอบน้ำต่ำ (low hydrophobicity) [8]

การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ข้างต้นมาจัดจำแนกด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ใช้ primer ที่จำเพาะต่อยีนบริเวณ 16S rRNA (forward primer bact-0341 5′-CCTACGGGNGGCWGCAG-3′ reverse primer bact-0785 5′-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3′) ปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 50 µL ประกอบด้วย DNA แม่แบบ 2 µL, 1x PCR buffer, $MgCl_2$ 1.5 mM, dNTPs 2 mM, primers each 10 µM และ Taq DNA polymerase 1.25 unit เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของ DNA โดยใช้ thermal cycler (Labnet International, Inc.) ดังนี้ denature 95°C เวลา 1 นาที annealing 55°C เวลา 1.30 นาที extension 72°C เวลา 1 นาที เวลา ตรวจผลการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย 1.5% gel electrophoresis ทำบริสุทธิ์ DNA แล้วส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จาก GenBank และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยโปรแกรม MEGA7

ผลการทดลอง

การแยกและทดสอบเบื้องต้นแบคทีเรียกรดแลคติค

สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติก จากมูลไก่พันธุ์พื้นเมืองได้ 171 ไอโซเลท เมื่อย้อมแกรมเพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าย้อมติดสีแกรมบวก ซึ่งมีรูปร่างกลม (cocci) 80 ไอโซเลท รูปร่างท่อน (bacilli) 70 ไอโซเลท และท่อนสั้น (coccobacilli) 21 ไอโซเลท และทั้ง 171 ไอโซเลทให้ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase เป็นลบ

การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

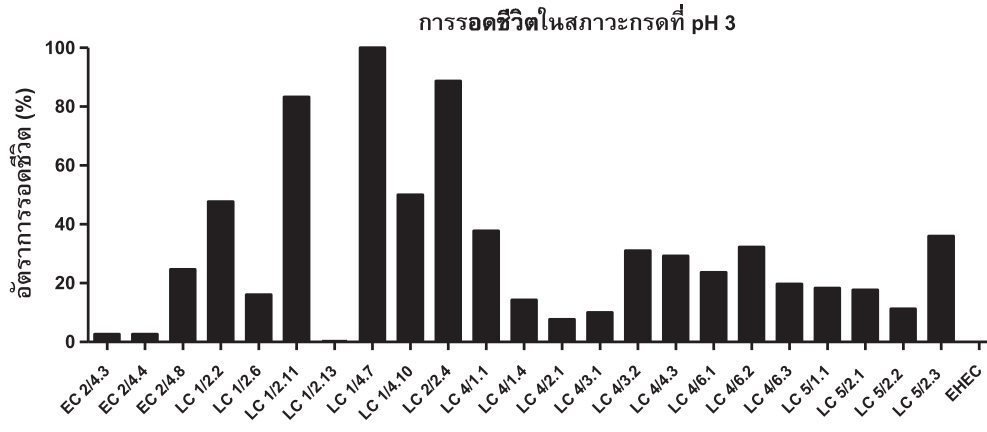
เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติก ที่แยกได้ทั้งหมด 171 ไอโซเลท มาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยใช้วิธี agar diffusion พบว่า มี 108 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) คิดเป็น 63.16%, มี 87 ไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญของ Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) คิดเป็น 50.88%, มี 62 ไอโซเลท ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 คิดเป็น 36.26%, มี 82 ไอโซเลทยับยั้ง *K. pneumoniae* ATCC 700603 คิดเป็น 47.95%, มี 136 ไอโซเลท ยับยั้ง *P. aeruginosa* ATCC 27853 คิดเป็น 79.53% และมี 65 ไอโซเลท ยับยั้ง S. Typhimurium (isolation strain) คิดเป็น 38% (ตารางที่ 1) ผลการศึกษาความสามารถยังยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จำนวน 23 ไอโซเลท สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรครวมได้ตั้งแต่ 3 สายพันธุ์ไปศึกษาคุณสมบัติการทนกรดเกลือน้ำดีและคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ต่อไป

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค (N=171)

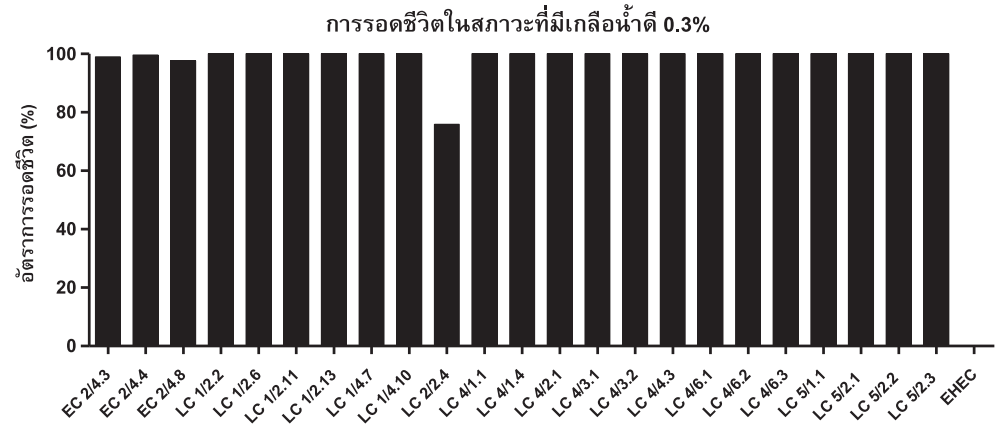
Pathogens	Number of inhibit pathogens and percentage
Enterohemorrhagic E. coli (EHEC)	108(63.16%)
Enteropathogenic E. coli (EPEC)	87 (50.88%)
S. aureus	62 (36.26%)
K. pneumoniae ATCC 700603	82 (47.95%)
P. aeruginosa ATCC 27853	136(79.53%)
S. Typhimurium (isolated strain)	65 (38.00%)

ความสามารถทนกรดและเกลือน้ำดี

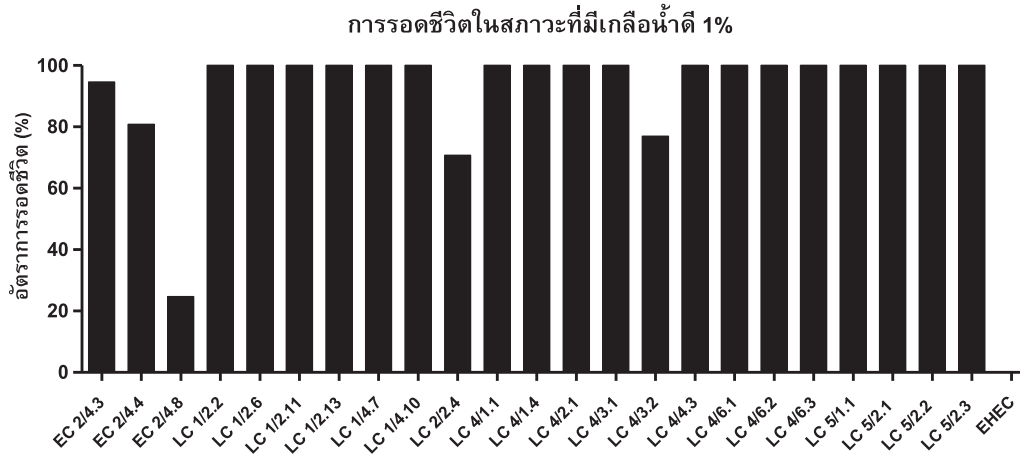
นำแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคมาทดสอบความสามารถทนกรดและทนเกลือน้ำดี เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยวัดอัตราการรอดชีวิต เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในสภาวะเป็นกรดที่ pH 2 และ pH 3 พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทนต่ออาหารที่มีค่าความเป็นกรด pH 2 ได้ต่ำมากจนไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ผลต่อได้ แต่สามารถทนกรดได้ที่ pH 3 มีอัตราการรอดชีวิตได้ดีที่สุด คือไอโซเลท LC 1/4.7 เท่ากับ 100% ส่วน LC 2/2.4, LC 1/2.11, LC 1/4.10 และ LC 1/2.2 มีอัตราการรอดชีวิต 88.71%, 83.33%, 50.00% และ 47.67% ตามลำดับ (รูปที่ 1) และจากการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยเลี้ยงในอาหารที่มีเกลือน้ำดี 0.3% และ 1.0% พบว่าเกือบทุกไอโซเลทมีอัตราการรอดชีวิตในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 0.3% ได้ 100% มีพียงไอโซเลท LC 2/2.4 ที่มีอัตราการรอดชีวิตต่ำสุด คือ 75.86 อัตราการรอดชีวิตในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 1.0% เกือบทุกไอโซเลทมีการรอดชีวิตมากกว่า 70% มีพียงไอโซเลท EC 2/4.8 ที่มีอัตราการรอดชีวิตต่ำสุด คือ 24.6% (รูปที่ 2 และ 3)



รูปที่ 1 การรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติก ในอาหารที่มี pH 3



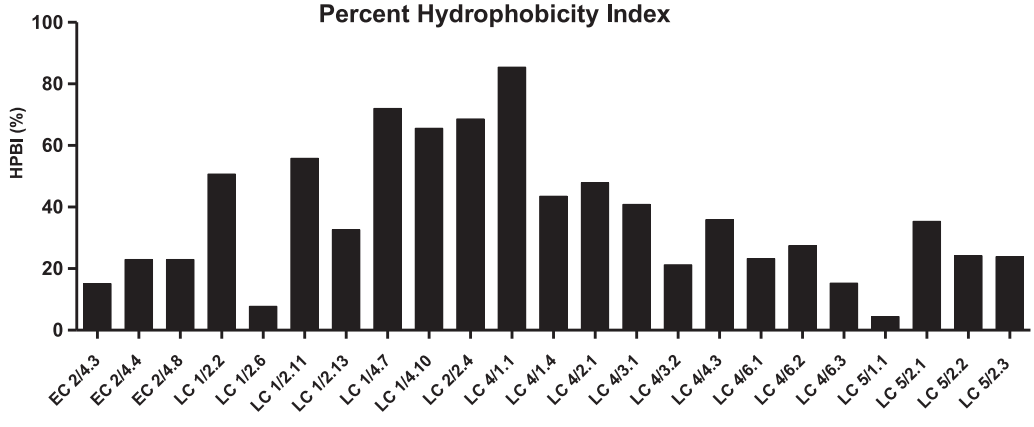
รูปที่ 2 การรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารที่มี ox gall 0.3%



รูปที่ 3 การรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารที่มี ox gall 1.0%

คุณสมบัติ hydrophobicity

คุณสมบัติความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) มีผลต่อความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ของแบคทีเรีย ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงทำการศึกษาคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยอาศัยการทำปฏิกิริยา (interaction) ระหว่างเชื้อกับ hexadecane ซึ่งเป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้ว และวิเคราะห์ผลจากค่า HPBI แบคทีเรียกรดแลคติกให้ผลการทดสอบคุณสมบัติความไม่ชอบน้ำสูงเกิน 50% คือไอโซเลท LC 4/1.1 มีค่า HPBI สูงที่สุดเท่ากับ 85.40% รองลงมาคือ 1/4.7, LC 2/2.4, LC 1/4.10, LC 1/2.11, LC 1/2.2 มีค่า HPBI เท่ากับ 71.96%, 68.06%, 65.56%, 55.81% และ 50.65% ตามลำดับ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 คุณสมบัติ Hydrophobicity Index (HPBI) แบคทีเรียกรดแลคติก

ตารางที่ 2 สรุปผลการทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกในเบื้องต้น

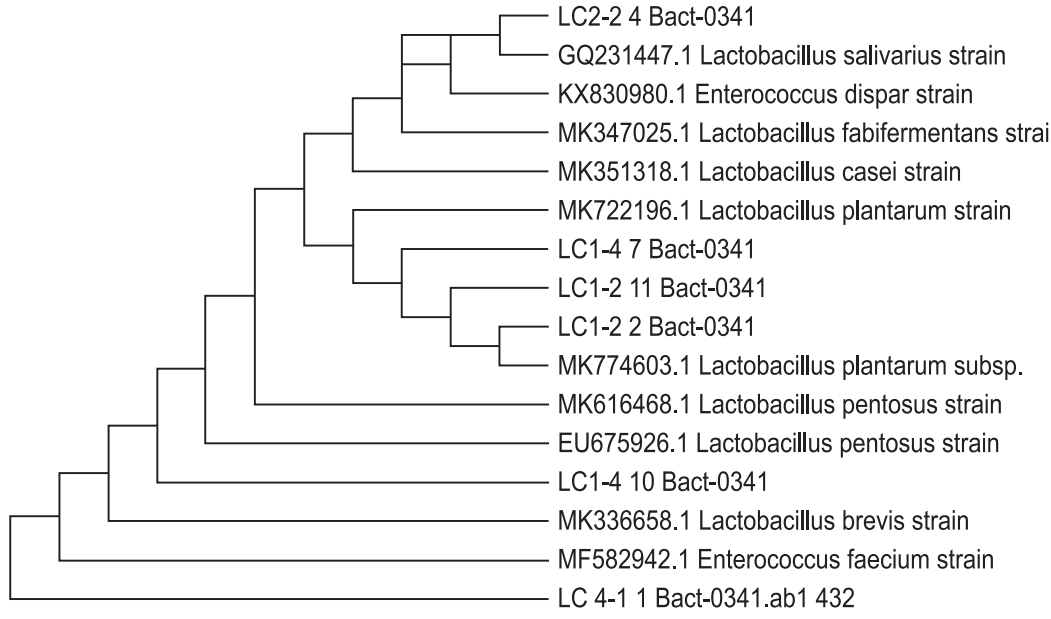
ไอโซเลท	รูปร่าง	แบคทีเรียทดสอบ (mm)						การรอดชีวิต (%)				HPBI(%)
		EHEC	EHEC	*S. aureus*	*K. pneumoniae*	*P. aeruginosa*	S. Typhimurium	pH 2	pH 3	เกลือน้ำดี 0.3 %	เกลือน้ำดี 1.0 %	
LC 1/2.2	ท่อนยาว	24	20	18	18	23	15	0	47.67	100	100	50.65
LC 1/2.11	ท่อนยาว	26	25	20	20	24	27	2	83	100	100	55.81
LC 1/4.7	ท่อนยาว	20	21	18	17	23	19	0	100	100	100	71.96
LC 1/4.10	ท่อนสั้น	20	18	11	19	21	16	0	50	100	100	65.56
LC 2/2.4	ท่อนยาว	21	24	14	26	25	21	0	88.71	75.86	70.67	68.06
LC 4/1.1	กลม	17	18	16	14	23	13	3.67	29.33	100	100	85.40

หมายเหตุ 1. การรอดชีวิต (%) = (N1/N0) x 100

2. HPBI (%) = [(A1-A2)/A1] x 100

การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลโดยรวม จากการทดสอบคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกเบื้องต้น พบเชื้อ 6 ไอโซเลทที่มีคุณสมบัติเหมาะสม คือ ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ตั้งแต่ 4 สายพันธุ์ได้ในระดับสูง สามารถอยู่รอดได้ในภาวะที่เป็นกรดและทนเกลือน้ำดี แม้ผลการทดสอบคุณสมบัติ Hydrophobicity Index ต่ำ แต่ยังมีคุณสมบัติที่ดีของโพรไบโอติกทางด้านอื่นๆ ซึ่งเป็นพื้นฐานเบื้องต้นที่จะนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นโพรไบโอติก โดยแลคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลท ได้แก่ LC 1/2.2, LC 1/2.11, LC 1/4.7, LC 1/4.10, LC 2/2.4 และ LC 4/1.1 (ตารางที่ 2) จากนั้นนำไปจำแนกสายพันธุ์ต่อไปด้วยวิธี PCR และยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ ด้วยวิธี DNA sequencing โดยใช้ specific 16s rRNA primers (บริเวณ V3-V6) ซึ่งให้ผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ขนาด 450 bp จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI พบว่าไอโซเลท LC 1/2.2, LC 1/2.11, LC 1/4.7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสาย DNA คล้ายกับเชื้อ *Lactobacillus plantarum* โดยมีค่า identity เท่ากับ 94.24%, 97% และ 99.27% ตามลำดับ ไอโซเลท 1/4.10 คล้ายกับเชื้อ *Enterococcus faecium* มีค่า identity เท่ากับ 99.29% ไอโซเลท LC 2/2.4 คล้ายกับเชื้อ *Lactobacillus salivarius* มีค่า identity เท่ากับ 99.07% และไอโซเลท LC 4/1.1 ไม่สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อได้ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ(Phylogenetic tree) ด้วยวิธี neighbor joining ด้วยโปรแกรม MEGA จากแผนภูมิ Phylogenetic tree สามารถจัดจำแนกเชื้อได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อแต่ละไอโซเลท (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ผลการจัดทำ phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทต์บริเวณ 16S rRNA gene เปรียบเทียบกับข้อมูลจากฐาน GenBank การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทต์และสร้างสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม MEGA (neighbor joining)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ปัจจุบันมีการนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกมาใช้ผสมในอาหารสัตว์เพื่อส่งเสริมการเจริญและสุขภาพสัตว์มากขึ้น อย่างไรก็ตาม ก่อนนำจุลินทรีย์มาใช้เป็นโพรไบโอติก จำเป็นต้องศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่ดีหลายประการเช่น ความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์เยื่อบุลำไส้ การทนต่อกรดและน้ำดี การเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร รวมถึงพิจารณาความปลอดภัยต่อเจ้าบ้าน ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกจะหลั่งกรดหรือสารบางชนิดออกมาเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ เพื่อให้แบคทีเรียกรดแลคติก สามารถเจริญได้ดีในสภาวะแวดล้อม สารอินทรีย์เหล่านั้นจะยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้เช่น *E. coli* และ *Salmonella* spp. [9] ชนิดของสารที่แบคทีเรียสร้างขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะแวดล้อม [10] จากการศึกษานี้ มีแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากมูลไก่พันธุ์พื้นเมืองจำนวน 136 ไอโซเลท สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดี โดยเฉพาะเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ 108 ไอโซเลท ยับยั้งเชื้อ EHEC ผลการศึกษาสอดคล้องกับหลายรายงานก่อนหน้า ที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกลุ่ม LAB สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุการก่อโรคทั้งในคนและในสัตว์ปีกได้ดี [11-12] คุณสมบัติดังกล่าวจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการป้องกันการติดเชื้อดังกล่าวต่อไก่ นอกจากนี้ที่ต่างออกไปและมีรายงานค่อนข้างน้อย คือ พบว่าเชื้อที่แยกได้สามารถยับยังเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดี แสดงให้เห็นศักยภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากทางเดินอาหารของไก่พันธุ์พื้นเมือง

การทนต่อกรดและเกลือน้ำดีเป็นสิ่งสำคัญสำหรับจุลินทรีย์โพรไบโอติก เนื่องโพรไบโอติกที่ดีจะต้องอยู่รอดและเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่รุนแรงของระบบทางเดินอาหารที่มีสภาวะเป็นกรดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้ ตลอดจนการมีเกลือน้ำดีในลำไส้เล็กมีผลต่อผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยทำให้โครงสร้างส่วนเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงไป [13] ในการศึกษานี้พบว่าเชื้อสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะที่เป็นกรดได้ที่ pH 3 ซึ่งเป็น pH ที่พบได้ในกระเพาะอาหารในสัตว์ปีก [14] ดังนั้นจึงมั่นใจได้ว่าเมื่อให้แบคทีเรียเข้าสู่ทางเดินอาหารของไก่ แบคทีเรียที่ได้จะยังคงรอดชีวิตในสภาวะดังกล่าว นอกจากความสามารถในการทนต่อสภาวะ pH ต่ำแล้ว แบคทีเรียกรดแลคติกยังต้องสามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ดี ซึ่งเกลือน้ำดีที่พบในทางเดินอาหารมีบทบาทในการย่อยไขมัน นอกจากนี้เกลือน้ำดียังมีสมบัติเป็น detergent ซึ่งมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยไปรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ดังนั้นแบคทีเรียที่แยกได้จำเป็นต้องมีการทดสอบคุณสมบัติดังกล่าว ในการศึกษานี้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทนเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 1.0% ระดับที่ใช้สำหรับการทดสอบครั้งนี้สูงกว่าในบางรายงาน ที่โดยส่วนใหญ่พบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก สามารถทนเกลือน้ำดีได้ที่ความเข้มข้น 0.3% [15-16] แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองในครั้งนี้มีความสามารถทนทานต่อสภาวะแวดล้อมในลำไส้ไก่ได้ดี

คุณสมบัติของการยึดเกาะกับเยื่อบุทางเดินอาหารระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกกับเจ้าบ้านจะช่วยป้องกันไม่ให้แบคทีเรียก่อโรคสามารถยึดเกาะกับผนังลำไส้ได้ การเกาะติดของเซลล์แบคทีเรียกับเยื่อบุของเจ้าบ้านเกี่ยวข้องกับพื้นผิวของเซลล์ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่จำเพาะระหว่างเซลล์จุลินทรีย์และเจ้าบ้าน กระบวนการยึดเกาะจะอาศัยกลไกเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนพื้นผิวของเซลล์และกรด lipoteichoic [17] จากผลการศึกษาพบว่า มีค่า HPBI แสดงถึงการไม่ชอบน้ำของแบคทีเรียที่แยกได้สูงสุดเท่ากับ 85.40% ซึ่งแสดงถึงการไม่ชอบน้ำที่สูง ซึ่งช่วยพยากรณ์ว่าเชื้อน่าจะมีความสามารถในการยึดเกาะกับผนังลำไส้ของไก่ได้ดี ผลการศึกษานี้อาจจะช่วยอธิบายสมมติฐานที่กล่าวว่าเหตุใดจึงควรเลือกใช้แบคทีเรียกรดแลคติกแยกได้จากสัตว์สปีชีส์เดียวกัน อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในประเด็นการยึดเกาะกับผนังลำไส้ โดยการใช้โมเดลเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เป็นตัวแทนในการทดสอบ ซึ่งหากได้ผลสอดคล้องกับค่า HPBI จะทำให้มีความชัดเจนยิ่งขึ้น [7, 18]

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลไก่ และนำทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกที่ดี ผลการศึกษาพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 6 ไอโซเลท ได้แก่ LC 1/2.2, LC 1/2.11, LC 1/4.7, LC 1/4.10, LC 2/2.4 และ LC 4/1.1 มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค การทนต่อสภาวะความเป็นกรดและในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีได้ พบว่าไอโซเลท LC 1/2.2, LC 1/2.11 และ LC 1/4.7 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสาย DNA คล้ายกับเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ไอโซเลท 1/4.10 คล้ายกับเชื้อ *Enterococcus faecium* ไอโซเลท LC 2/2.4 คล้ายกับเชื้อ *Lactobacillus salivarius* และไอโซเลท LC 4/1.1 ไม่สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อได้ เหมาะที่จะนำไปทดสอบคุณสมบัติอื่นๆ เพื่อสามารถนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในไก่อย่างเหมาะสมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ หลักสูตรจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยสำหรับการศึกษานี้ รวมทั้งอำนวยความสะดวกการใช้เครื่องมือต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

1. Naseem, S., Rahman, S. U., Shafee, M., Sheikh, A. A., & Khan, A. (2012). Immunomodulatory and growth-promoting effect of a probiotic supplemented in the feed of broiler chicks vaccinated against infectious bursal disease. *Brazilian Journal of Poultry Science, 14*(2), 109-113.
2. Lutful Kabir, S. M. (2009). The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of Molecular Sciences, 10*(8), 3531-3546.
3. Rahman, M. M., Hossain, K, M., & Rahman, S. M. M. (2016). Isolation, characterization, and properties study of probiotic lactic acid bacteria of selected yoghurt from Bangladesh. *African Journal of Microbiology Research, 10*(1), 23-31.
4. Dowarah, R., Verma, A. K., Agarwal, N., & Singh, P. (2018). Efficacy of species-specific probiotic *Pediococcus acidilactici* FT28 on blood biochemical profile, carcass traits and physicochemical properties of meat in fattening pigs. *Research in Veterinary Science, 117,* 60-64.
5. Campana, R., van Hemert, S., & Baffone, W. (2017). Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathogens, 9,* 12.
6. Anas, M., Boumehira, A., Amine Rizk, H., Jamal Eddine, H., & Mebrouk, K. (2012). Screening of autochthonous *Lactobacillus* species from Algerian raw goats' milk for the production of bacteriocin-like compounds against Staphylococcus aureus. *African Journal of Biotechnology, 11*(20). 4595-4607
7. Feng, J. C., Wang, L. H., Zhou, L. X., Yang, X., & Zhao, X. (2016). Using In Vitro Immunomodulatory Properties of Lactic Acid Bacteria for Selection of Probiotics against Salmonella Infection in Broiler Chicks. *PLoS One, 11*(1). 1-14.
8. Rosenberg, M., Gutnick, D., and Rosenberg, E. . (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *Oxford Journal, 9*(1), 29-33.
9. Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A., & Maneerat, S. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World Journal of Microbiology & Biotechnology, 25*(8), 1337-1345.

10. Gonzalez, L., Sandoval, H., Sacristan, N., Castro, J. M., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2007). Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control, 18*(6), 716-722.
11. Murry, A., & Hinton, A. (2006). Comparison of in vitro inhibition of growth of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* on broiler feed media by two sources of *Bacillus subtilis. Poultry Science, 85,* 192-193.
12. Kizerwetter-Swida, M., & Binek, M. (2005). Selection of potentially probiotic *Lactobacillus* strains towards their inhibitory activity against poultry enteropathogenic bacteria. *Polish journal of microbiology, 54*(4), 287-294.
13. Taranto, M. P., Perez-Martinez, G., & de Valdez, G. F. (2006). Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Research in Microbiology, 157*(8), 720-725.
14. Strompfova, V., & Laukova, A. (2007). In vitro study on bacteriocin production of *Enterococci* associated with chickens. *Anaerobe, 13*(5-6), 228-237.
15. Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., & Jalaludin, S. (1998). Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Letters in Applied Microbiol, 27*(3), 183-185.
16. Idoui T. (2014). Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from gizzard of local poultry. *Iranian journal of microbiology, 6*(2), 120-126.
17. Rojas, M., Ascencio, F., & Conway, P. L. (2002). Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. *Applied and Environmental Microbiology, 68*(5), 2330-2336.
18. Balcazar, J. L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J. L., & Girones, O. (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture, 278*(1-4), 188-191.