

รายงานการวิจัยเรื่อง

การแยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียและบาซิลลัสสปีชีส์จากทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ ดิน และตะกอนดินจากป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส ที่มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Isolation of lactic acid bacteria and *Bacillus* spp. with probiotic properties from aquatic fauna, soil and sediment from Plu Tao Daeng peat swamp forest, Narathiwat province for aquatic applications

โดย

เสน่ห์ แก้วพรัตน์ ศุภยางค์ วรวิฑูริคุณชัย จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล
หิฎฎา แก้วพรัตน์ มาเนศ บุญยานันต์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการพิเศษเพื่อประสานงาน
โครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (สำนักงาน กปร.) ประจำปีงบประมาณ 2558

รายงานการวิจัยเรื่อง

การแยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียและบาซิลลัสสปีชีส์จากทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ ดิน และตะกอนตมจากป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส ที่มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Isolation of lactic acid bacteria and *Bacillus* spp. with probiotic properties from aquatic fauna, soil and sediment from Plu Tao Daeng peat swamp forest, Narathiwat province for aquatic applications

โดย

เสน่ห์ แก้วพรัตน์ ศุภยางค์ วรุฒิคุณชัย จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล
ัญญา แก้วพรัตน์ มาณศ บุนยานันต์

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการพิเศษเพื่อประสานงาน
โครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (สำนักงาน กปร.) ประจำปีงบประมาณ 2558

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ

สำนักงานคณะกรรมการพิเศษเพื่อประสานงานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (สำนักงาน กปร.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2558

ศูนย์ศึกษาการพัฒนาพิกุลทอง อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดนราธิวาส ศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร และป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการประสานงาน และเป็นสถานที่ในการเก็บตัวอย่างสำหรับการทำวิจัย

คุณพลีชีพ หล้าหีส ศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร จังหวัดนราธิวาส ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง

นางสาวเจนจิตต์ คงกำเนิด ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา อ.เมือง จ.สงขลา และ ผศ.ดร.นเรศ ชวนยุก หัวหน้าศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจกรรม ศุภมาตย์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ เชื้อก่อโรคในปลาเพื่อใช้ในการทำวิจัย

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา ซึ่งเป็นสถานที่สำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

คณะผู้วิจัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะค้นหาเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียโดยเฉพาะเชื้อ *Lactobacillus* spp. และเชื้อ *Bacillus* spp. จากดิน ตะกอนตมและจากทางเดินอาหารของสัตว์น้ำที่มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก (probiotic) จากป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส เพื่อนำไปใช้สำหรับป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์น้ำเศรษฐกิจ หรืออาจจะพัฒนาเป็นโพรไบโอติกสำหรับใช้ในคน ซึ่งสามารถแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. ได้ 150 isolate และเชื้อ *Bacillus* spp. ได้ 122 isolate จากเชื้อทั้งหมดนี้ได้คัดเลือกเชื้อ 3 isolate คือ *Lactobacillus* spp. รหัส LS7 ที่แยกได้จากดิน และ รหัส LF8 ที่แยกได้จากปลา และ *Bacillus* sp. รหัส BS48 ที่แยกได้จากดิน ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลา 2 ชนิด และเชื้อก่อโรคในคน 7 ชนิดได้ดี มาจำแนกสายพันธุ์โดยการทำ 16S rDNA sequencing พบว่า เชื้อ LS7, LF8 และ BS48 เป็นเชื้อ *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* และ *Bacillus subtilis* ตามลำดับ

นำเชื้อ LS7, LF8 และ BS48 มาศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ โดยใช้เชื้อ *L. rhamnosus* GG ซึ่งเป็นโพรไบโอติกที่สำคัญมาเปรียบเทียบ เมื่อศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เชื้อเหล่านี้สร้างขึ้น พบว่า LS7, LF8 สามารถสร้างกรดแลคติก และกรดอะซิติกได้สูง ส่วน BS48 ไม่ได้สร้างกรดทั้ง 2 ชนิด ทั้งเชื้อ LS7 และ LF8 สร้าง H_2O_2 ได้สูง ส่วน BS48 สร้างได้ปานกลาง เชื้อ LF8 และ BS48 สร้างสารที่ถูกละลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนและความร้อนซึ่งอาจจะเป็นสารโปรตีนในกลุ่มแบคทีริโอซิน เชื้อทั้ง 3 ตัว มีความสามารถในการยึดเกาะกับเมือกในทางเดินอาหารและเมือกที่ติดตัวปลาของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ได้ดี ถ้าเชื้อสามารถเกาะกับเมือกปลาได้ดีจะมีโอกาสอยู่กับทางเดินอาหารของปลาและที่ตัวปลาได้นาน สามารถยับยั้งการเกาะของเชื้อก่อโรคของปลาคือ *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* ต่อเมือกของลำไส้ปลาได้ดี และสามารถเกาะกลุ่มกับเชื้อก่อโรคได้ ซึ่งเป็นกลไกอย่างหนึ่งในการป้องกันไม่ให้เชื้อก่อโรคเข้าไปยึดเกาะกับเมือกหรือเซลล์ของปลา เชื้อ LS7 และ LF8 เกาะกลุ่มกันเองได้ดี สามารถสร้างไบโอฟิล์มได้สูง ส่วน BS48 เกาะกลุ่มกันเองได้น้อยและสร้างไบโอฟิล์มได้ต่ำ การที่เชื้อเกาะกลุ่มกันเองได้ดีและสร้างไบโอฟิล์มได้เป็นกลไกอย่างหนึ่งที่จะทำให้เชื้อเกาะกับเมือกหรือเซลล์ของปลาและป้องกันการเกาะของเชื้อโรครกับตัวปลาได้ เชื้อทุกตัวมีปริมาณลดลงเมื่ออยู่ในกรด pH 2 แต่จะทนต่อ pH 3-pH 6 ได้นานกว่า 3 ชม. และทนน้ำดีของปลา 10% (v/v) ได้ การที่เชื้อทนกรดและทนน้ำดีได้จะทำให้เชื่อนั้นมีโอกาสมีชีวิตรอดเมื่อผ่านกระเพาะอาหารที่เป็นกรดและส่วนที่มีน้ำดีในทางเดินอาหาร ไปเจริญในลำไส้ได้ เนื่องจาก BS48 สามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี จึงได้นำสปอร์ของเชื่อนี้มาเตรียมเป็นเฟลเลตอาหารปลาลอยพบว่าได้สูตรของเฟลเลตที่เหมาะสม คือมีเชื้ออยู่ประมาณ

4.1×10^8 สปอร์ต่อกรัม ความกร่อนน้อยกว่า 1% และสามารถลอยน้ำได้นานกว่า 30 นาที เพลเลตนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบของผลิตภัณฑ์เพื่อการนำส่งโพรไบโอติกให้กับปลาหรือสัตว์น้ำได้

เมื่อนำเชื้อไปศึกษาความสามารถในการเป็นโพรไบโอติกสำหรับคนพบว่าเชื้อ LS7 ทนน้ำย่อยในกระเพาะอาหารจำลอง pH 2 ได้นานกว่า LF7 และ BS48 เชื้อ LS7 กับ LF8 ทนน้ำดี 0.3% (w/v) ได้ดีกว่า BS48 เชื้อทุกตัวทนต่อน้ำย่อยในลำไส้เล็กจำลองและน้ำในช่องคลอดจำลองได้นานกว่า 4 ชม. เชื้อ LS7 และ LF8 เกาะกับ Caco-2 ซึ่งเป็นเซลล์จากลำไส้และ HeLa ซึ่งเป็นเซลล์ในช่องคลอดของคนได้ดีกว่า BS48 และทุกตัวสามารถยับยั้งการเกาะของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Gardnerella vaginalis* ต่อ Caco-2 และ HeLa ตามลำดับได้ดี ซึ่งคุณสมบัติหลายอย่างของเชื้อทั้ง 3 ตัว มีข้อดีใกล้เคียงกับ *L. rhamnosus* GG ที่ใช้เปรียบเทียบ สรุปได้ว่าเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantum* LF8 มีคุณสมบัติที่เหมาะสม สามารถนำไปพัฒนาเป็นโพรไบโอติกในปลาหรือสัตว์น้ำและในคนได้ ส่วน *B. subtilis* BS48 เหมาะที่จะใช้เป็นโพรไบโอติกในปลาหรือสัตว์น้ำได้ แต่ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในคน อย่างไรก็ตามการที่จะนำเชื้อโพรไบโอติกไปใช้ให้เกิดประโยชน์ที่แท้จริงนั้น จะต้องมีการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องอื่น ๆ รวมถึงดูประสิทธิภาพของเชื้อเมื่อนำไปใช้จริงในภาคสนาม และถ้าเป็นโพรไบโอติกสำหรับคนจะต้องประเมินถึงความปลอดภัย และมีผลยืนยันประสิทธิภาพทางคลินิกประกอบด้วย

คำหลัก: ปาฟรุโตะแดง, โพรไบโอติก (probiotic), *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp., *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8, *Bacillus subtilis* BS48

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ญ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ท
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria)	4
บาซิลลัสสปีชีส์ (<i>Bacillus</i> spp.)	5
เชื้อก่อโรคในปลาและเชื้อโพรไบโอติกที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย	5
เพลเลต (Pellet)	7
การคัดเลือกเชื้อสำหรับใช้เป็นโพรไบโอติก	7
ป่าพรุโต๊ะแดง (Tou Dang peat swamp forest)	8
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	10
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	11
1. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษา และสภาวะในการเพาะเลี้ยง	11
2. การเก็บตัวอย่างดิน ตะกอนตม และสัตว์น้ำ จากป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส	11
3. วิธีแยกเชื้อ <i>Lactobacillus</i> spp. และ <i>Bacillus</i> spp. จากดิน ตะกอนตม และทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ	11
4. ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลาและเชื้อก่อโรคในคนของเชื้อ <i>Lactobacillus</i> spp. และ <i>Bacillus</i> spp. โดยใช้ spot method	15
5. การจำแนกเชื้อ <i>Lactobacillus</i> spp. และ <i>Bacillus</i> sp. ด้วยการทำให้ 16S rDNA sequencing	16
5.1 ความสามารถในการสร้างกรดแลคติก (lactic acid), กรดอะซิติก (acetic acid) และ hydrogen peroxide	
5.2 ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อที่อาจจะเป็นโปรตีนหรือแบคเทอริโอซิน	
6. การศึกษาสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของ <i>L. pentosus</i> LS7, <i>L. plantarum</i> LF8, <i>B. subtilis</i> BS48 และ <i>L. rhamnosus</i> GG	18

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

6.1	ความสามารถในการสร้างกรดแลคติก (lactic acid) และกรดอะซิติก (acetic acid)	
6.2	ความสามารถในการผลิต hydrogen peroxide	
6.3	ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อที่อาจจะเป็นโปรตีนหรือแบคทีริโอซิน	
7.	การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ	19
8.	ความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อกับเมือกที่ติดตัวปลาและเมือกจากทางเดินอาหารของปลา	20
8.1	การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ	
8.2	การเตรียมเมือกที่ติดตามตัวปลาและเมือกจากทางเดินอาหารของปลา	
8.3	การวัดปริมาณโปรตีนของเมือกจากปลา	
8.4	การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับเมือกที่ติดตัวปลาและเมือกจากทางเดินอาหารของปลา	
8.5	ความสามารถในการแทรกตัวเข้าไปในเมือกปลา	
8.6	การทดสอบว่าเชื้อยึดเกาะกับเมือกของปลาแบบจำเพาะเจาะจงหรือไม่	
8.7	การทดสอบความสามารถในการแย่งการยึดเกาะกับเมือกของปลาระหว่างเชื้อ <i>Lactobacillus</i> spp. และ <i>B. subtilis</i> BS48 กับเชื้อก่อโรคของปลาด้วยกลไก competitive exclusion	
9.	ความสามารถในการเกาะกลุ่มกับเชื้อก่อโรคและการทดสอบความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์	23
9.1	ความสามารถในการเกาะกลุ่มกับเชื้อก่อโรค	
9.2	การทดสอบความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์	
10.	ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม	24
11.	ความสามารถในการทนต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรงในทางเดินอาหารของปลา	24
11.1	การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ	
11.2	ความสามารถในการทนต่อ pH ในทางเดินอาหารจำลองของปลา	
11.3	ความสามารถในการทนต่อน้ำดีของปลา	
12.	การเตรียมเพลเลตต้นแบบจากเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> BS48	25
12.1	การเตรียมสปอร์ของเชื้อ <i>B. subtilis</i> BS48	
12.2	การเตรียมสูตรเพลเลต	
12.3	ศึกษาสมบัติทางกายภาพของเพลเลต	
13.	ความสามารถของเชื้อในการมีชีวิตรอดในสภาวะจำลองของทางเดินอาหารและช่องคลอดของคน	29
13.1	การเตรียมเชื้อสำหรับการทดสอบ	
13.2	ความสามารถทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหารจำลอง	
13.3	ความสามารถในการทนต่อน้ำดี	

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

13.4	ความสามารถในการทนต่อน้ำย่อยในลำไส้เล็กจำลอง	
13.5	ความสามารถในการทนต่อน้ำในช่องคลอดจำลอง	
13.6	ความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ผนังลำไส้และเซลล์ช่องคลอดของคน	
13.7	ความสามารถในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารและช่องคลอด	
14.	สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์	35
บทที่ 3 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง		36
1.	ผลจากการเก็บตัวอย่างดิน ตะกอนตมและสัตว์น้ำจากป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส	36
2.	ผลการแยกเชื้อ <i>Lactobacillus</i> spp. และ <i>Bacillus</i> spp. จากดิน ตะกอนตมและทางเดินอาหารของสัตว์น้ำจากป่าพรุโต๊ะแดง	36
3.	ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของปลาและของคนของเชื้อ <i>Lactobacillus</i> spp. และ <i>Bacillus</i> pp. ที่แยกได้	37
4.	การจำแนกเชื้อ <i>Lactobacillus</i> spp. และ <i>Bacillus</i> sp. ด้วยการทำ 16S rDNA sequencing	40
5.	การศึกษาสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของ <i>L. pentosus</i> LS7, <i>L. plantarum</i> LF8 และ <i>B. subtilis</i> BS48	43
6.	การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ	46
7.	ความสามารถในการยึดเกาะกับเมือกจากทางเดินอาหารของปลาและเมือกที่ติดตัวปลา	47
7.1	ความสามารถในการยึดเกาะกับเมือกจากทางเดินอาหารของปลาและเมือกที่ติดตัวปลา	
7.2	ความสามารถในการแทรกตัวเข้าไปในเมือกจากทางเดินอาหารของปลาและเมือกที่ติดตัวปลา	
7.3	การทดสอบว่าเชื้อยึดเกาะกับเมือกของปลาแบบจำเพาะเจาะจงหรือไม่	
7.4	การทดสอบความสามารถในการแย่งการยึดเกาะกับเมือกของปลากับเชื้อก่อโรคในปลา	
8.	ความสามารถในการเกาะกลุ่ม (co-aggregation) กับเชื้อก่อโรค	53
9.	การทดสอบความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์	54
10.	ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม	55
11.	ความสามารถในการทนต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรงในทางเดินอาหารของปลา	56
11.1	ความสามารถในการทนต่อ pH 2, pH 3, pH 5 และ pH 6	
11.2	ความสามารถในการทนต่อน้ำดีของปลา	
12.	การเตรียมเพลเลตอาหารปลาต้นแบบจากเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> BS48	57
13.	การศึกษาศักยภาพของเชื้อที่แยกได้สำหรับใช้เป็นโพรไบโอติกในคน	63
13.1	ความสามารถทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหารจำลอง	

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

13.2	ความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี (bile salt)	
13.3	ความสามารถในการทนต่อน้ำย่อยในลำไส้จำลอง	
13.4	ความสามารถในการทนน้ำในช่องคลอดจำลอง	
13.5	ความสามารถในการยึดเกาะกับ Caco-2 cell และ HeLa cell	
13.6	ความสามารถในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารและช่องคลอด	
บทที่ 4	สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	74
บทที่ 5	เอกสารอ้างอิง	78
ประวัติผู้วิจัย		88

สารบัญตาราง

			หน้า
ตารางที่	2.1	สูตรในการเตรียมเพลเลตของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> BS48	26
ตารางที่	3.1	ผลการแยกเชื้อ <i>Lactobacillus</i> spp. และ <i>Bacillus</i> spp. จากดินและตะกอนตม 50 ตัวอย่างและจากสัตว์น้ำ 100 ตัวอย่าง จากป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส ได้ <i>Lactobacillus</i> spp. 150 isolate และ <i>Bacillus</i> spp. 122 isolate	39
ตารางที่	3.2	จำนวน isolate ของ <i>Lactobacillus</i> spp. และ <i>Bacillus</i> spp. ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลาและเชื้อก่อโรคในคนด้วย spot method (จำแนกกลุ่มจากขนาดของ inhibition zone)	39
ตารางที่	3.3	เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของ 16s rDNA เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับเชื้อ <i>Lactobacillus</i> LS7	41
ตารางที่	3.4	เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของ 16s rDNA เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับเชื้อ <i>Lactobacillus</i> LF8	41
ตารางที่	3.5	เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของ 16s rDNA เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับเชื้อ <i>Bacillus</i> B48	42
ตารางที่	3.6	ปริมาณกรดแลคติกและกรดอะซิติกที่ผลิตโดยเชื้อ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8 และ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ใน MRSB บ่มเพาะในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C, 48 ชม. และ <i>Bacillus subtilis</i> BS48 ที่เลี้ยงใน BHIB บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C, 48 ชม. และความสามารถในการสร้าง hydrogen peroxide ของเชื้อทั้ง 3 ชนิด	44
ตารางที่	3.7	ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนและความร้อนต่อสารชีวภาพที่ผลิตโดย <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8, <i>Bacillus subtilis</i> BS48 และ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ที่ความเข้มข้น 50x ของความเข้มข้นตั้งต้น ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลา <i>Aeromonas hydrophila</i> และ <i>Streptococcus agalactiae</i>	45

สารบัญตาราง (ต่อ)

			หน้า
ตารางที่	3.8	แสดงค่าความไวของเชื้อ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8 และ <i>Bacillus subtilis</i> BS48 ต่อยาปฏิชีวนะ	46
ตารางที่	3.9	แสดงระดับความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์	54
ตารางที่	3.10	สมบัติทางกายภาพของเพลเลต	61
ตารางที่	3.11	จำนวนสปอร์ของ <i>Bacillus subtilis</i> BS48 ที่อยู่รอดในเพลเลตในสภาวะน้ำย่อยในกระเพาะอาหารจำลอง	63

สารบัญรูป

	หน้า	
รูปที่ 2.1	ตัวอย่างดิน (ก) และการเตรียมตัวอย่างดิน (ข)	12
รูปที่ 2.2	วิธีเก็บตัวอย่างจากทางเดินอาหารของปลา (ก-ง)	13
รูปที่ 2.3	กระบวนการเตรียมเพลเลตด้วยวิธี extrusion – spheronization	27
รูปที่ 3.1	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Lactobacillus</i> spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ de Man Rogosa and Sharpe agar (ก), รูปร่างของเชื้อเป็นรูปแท่ง ติดสีแกรมบวก (ข)	38
รูปที่ 3.2	ลักษณะโคโลนีของเชื้อ <i>Bacillus</i> spp. บนอาหาร brain heart infusion agar (ก), รูปร่างของตัวเชื้อเป็นรูปแท่ง ติดสีแดง และสปอร์ย้อมติดสีเขียวจากการย้อมสปอร์ (ข)	38
รูปที่ 3.3	Inhibition zone รอบ ๆ spot ของเชื้อ <i>Lactobacillus</i> sp. (ก), และ <i>Bacillus</i> sp. (ข) ที่แยกได้จากดินต่อเชื้อ <i>Aeromonas hydrophila</i> จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคปลาด้วย spot method	40
รูปที่ 3.4	Inhibition zone ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก <i>Bacillus subtilis</i> BS48 ต่อเชื้อก่อโรคในปลา <i>Aeromonas hydrophila</i>	45
รูปที่ 3.5	ความสามารถในการยึดเกาะเมือกของปลานิลของเชื้อ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8, <i>Bacillus subtilis</i> BS48 และ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG กับเมือกจากลำไส้และเมือกที่ติดตัวปลา	48
รูปที่ 3.6	ความสามารถในการแทรกตัวเข้าไปในเมือกจากลำไส้ (ก), และเมือกที่ติดตัวปลา (ข) ของปลานิลโดยเชื้อ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8, <i>Bacillus subtilis</i> BS48 และ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	49

สารบัญรูป (ต่อ)

		หน้า
รูปที่ 3.7	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8, <i>Bacillus subtilis</i> BS48 และ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG กับเมือกจากลำไส้ของปลาชนิด bovine serum albumin และพื้นผิวที่เป็น polystyrene	50
รูปที่ 3.8	ความสามารถในการยับยั้งการเกาะของเชื้อ <i>Aeromonas hydrophila</i> (ก), และเชื้อ <i>Streptococcus agalactiae</i> (ข), ด้วยกลไก competitive exclusion ของ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8, <i>Bacillus subtilis</i> BS48 และ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG บนเมือกจากลำไส้ของปลาชนิด, * = $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับ HA เดี่ยว ๆ หรือ SA เดี่ยว ๆ	52
รูปที่ 3.9	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเกิดการเกาะกลุ่มของเชื้อ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8, <i>Bacillus subtilis</i> BS48 และ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG กับเชื้อก่อโรคของปลา <i>Aeromonas hydrophila</i> และ <i>Streptococcus agalactiae</i> , * = $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับ LS7 และ GG	53
รูปที่ 3.10	การเกิดการเกาะกลุ่ม (co-aggregation) ของ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7 กับเชื้อก่อโรคในปลา <i>Aeromonas hydrophila</i>	54
รูปที่ 3.11	ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8, <i>Bacillus subtilis</i> BS48 และ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, เชื้อที่มีค่า OD สูงแสดงว่าสร้างไบโอฟิล์มได้ดี * = $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ GG, * * = $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับ LF8 และ GG (วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร)	55
รูปที่ 3.12	ความสามารถในการทนต่อ pH 2, pH 3, pH 5 และ pH 6 ของ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8, <i>Bacillus subtilis</i> BS48 และ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, * = $p < 0.05$ (เปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อเริ่มต้น)	56

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า	
รูปที่ 3.13	ความสามารถในการมีชีวิตรอดของเชื้อ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8, <i>Bacillus subtilis</i> BS48 และ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ใน 10% (v/v) น้ำดีของปลานิล	57
รูปที่ 3.14	ตัวเชื้อ (vegetative cell) และสปอร์ของเชื้อ (endospore) ของ <i>Bacillus subtilis</i> BS48 จากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10X100 เท่า	58
รูปที่ 3.15	สปอร์ของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> BS48 ในน้ำเกลือ	58
รูปที่ 3.16	ลักษณะของเพลเลตในแต่ละสูตรตำรับ (ต่างกำลังขยาย)	59
รูปที่ 3.17	ลักษณะพื้นผิวของเพลเลตภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ต่างกำลังขยาย)	60
รูปที่ 3.18	ความสามารถในการลอยน้ำของเพลเลตสูตรต่างๆ เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที	61
รูปที่ 3.19	ความสามารถในการลอยน้ำของเพลเลตที่เวลาต่าง ๆ	62
รูปที่ 3.20	ความสามารถในการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหารจำลอง pH 2, pH 3 และ pH 4 ของ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8, <i>Bacillus subtilis</i> BS48 และ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, * = $p < 0.05$ (เปรียบเทียบับจำนวนเชื้อเริ่มต้น)	64
รูปที่ 3.21	ความสามารถในการมีชีวิตรอดในน้ำดี (0.3% w/v oxgall) ของเชื้อ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8, <i>Bacillus subtilis</i> BS48 และ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG * = $p < 0.05$ (เปรียบเทียบับจำนวนเชื้อเริ่มต้น)	65
รูปที่ 3.22	ความสามารถในการมีชีวิตรอดในน้ำย่อยจำลองของลำไส้ของคน pH 6.8 ของเชื้อ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8, <i>Bacillus subtilis</i> BS48 และ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	66
รูปที่ 3.23	ความสามารถในการมีชีวิตรอดในน้ำในช่องคลอดจำลองของคน ของเชื้อ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8, <i>Bacillus subtilis</i> BS48 และ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	67

สารบัญรูป (ต่อ)

			หน้า
รูปที่	3.24	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8, <i>Bacillus subtilis</i> BS48 และ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG กับ Caco-2 cell, *= p<0.05 (เปรียบเทียบกัน LS7 และ GG)	69
รูปที่	3.25	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8, <i>Bacillus subtilis</i> BS48 และ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG กับ HeLa cell * = p < 0.05 (เปรียบเทียบกัน LS7 และ GG)	69
รูปที่	3.26	การยึดเกาะของเชื้อ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7 กับ Caco-2 cell (ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน, SEM)	70
รูปที่	3.27	การยึดเกาะของเชื้อ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7 กับ HeLa cell (ภาพจากกล้อง inverted microscope)	70
รูปที่	3.28	การยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ <i>Escherichia coli</i> ของ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8, <i>Bacillus subtilis</i> BS48 และ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG กับ Caco-2 cell, * = p < 0.05 (เปรียบเทียบกับการยึดเกาะของ <i>E. coli</i> เดี่ยว ๆ)	71
รูปที่	3.29	การยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ <i>Gardnerella vaginalis</i> ของ <i>Lactobacillus pentosus</i> LS7, <i>Lactobacillus plantarum</i> LF8, <i>Bacillus subtilis</i> BS48 และ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG กับ HeLa cell , * = p < 0.05 (เปรียบเทียบกับการยึดเกาะของ <i>G. vaginalis</i> เดี่ยว ๆ)	72

สัญลักษณ์และคำย่อ

ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovine serum albumin
CFU	Colony forming unit
DNA	Deoxyribonucleic acid
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
rpm	Round per minute
ng	Nanogram
IU	International Unit
μl	Microliter
μg	Microgram
μm	Micrometer
μmole	Micromole
°C	Degree Celsius
ชม.	ชั่วโมง
มก.	มิลลิกรัม
มคก.	ไมโครกรัม
มล.	มิลลิลิตร
มคล.	ไมโครลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ

BHIA	Brain heart infusion agar
BHIB	Brain heart infusion broth
DSM	Difco sporulation medium
MHA	Mueller-Hinton agar
MHB	Mueller-Hinton broth
MRSA	de Man Rogosa and Sharpe agar
MRSB	de Man Rogosa and Sharpe broth
SCDB	Soybean-casein digest broth

สัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

เชื้อจุลินทรีย์

<i>A. hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>G. vaginalis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>
<i>L. pentosus</i> LS7	<i>Lactobacillus pentosus</i> LS7
<i>L. plantarum</i> LF8	<i>Lactobacillus plantarum</i> LF8
<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. sonnei</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i>
<i>V. Cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำกรวิจัย

ประเทศไทยเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติทางอาหารที่อุดมสมบูรณ์ และมีอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่เจริญก้าวหน้าทำให้ประเทศไทยเป็นแหล่งวัตถุดิบที่ใช้ผลิตอาหารที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก แต่ละปีจะมีรายได้จากการส่งออกสัตว์น้ำจากธรรมชาติ และสัตว์น้ำที่เพาะเลี้ยงโดยเฉพาะปลาและกุ้งเป็นจำนวนเงินหลายพันล้านบาท อย่างไรก็ตามอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำยังประสบปัญหาในหลายด้าน ซึ่งส่งผลต่อการส่งออกสินค้าและเศรษฐกิจของประเทศ ปัญหาสำคัญของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างหนึ่งคือ การเกิดโรคติดเชื้อในสัตว์ ซึ่งมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น การเลี้ยงสัตว์ที่หนาแน่นเกินไป มีสารอินทรีย์ที่หลงเหลือจากอาหารที่ให้สัตว์กินสะสมอยู่ในน้ำจำนวนมาก เกิดความไม่สมดุลกันระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ในสัตว์และจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม ทำให้เชื้อก่อโรคหรือเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic bacteria) เพิ่มจำนวนมากขึ้น ทำให้สัตว์ล้มป่วยหรือตาย (Austin et al., 1995) เชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำหรือในปลาที่พบบ่อยได้แก่เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Streptococcus agalactiae*, *Yersinia ruckeri* และ *Vibrio anguillarum* (Balcázar et al., 2008) เชื้อ *Aeromonas hydrophila* เป็นเชื้อก่อโรคที่สำคัญ ทำให้ปลาเกิดเป็นแผลที่ลำตัว เกล็ดหลุด เม็ดเลือดแตกตามจุดต่าง ๆ และเกิดการติดเชื้อในกระแสเลือด โรคที่เกิดจากเชื้อชนิดนี้พบได้ทั่วโลกและทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจจำนวนมาก (Austin and Austin, 1999) นอกจากนี้พบว่าในปลาน้ำจืดสามารถพบเชื้อโรคของคนอยู่ในทางเดินอาหารได้ เช่น เชื้อ *Aeromonas caviae*, *Aeromonas jandaei*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas veronii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* (Sugita et al., 1996) การใช้ยาปฏิชีวนะในการป้องกัน และรักษาโรคติดเชื้อในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในระดับอุตสาหกรรมเป็นสิ่งที่ทำกันอย่างแพร่หลาย และยังมีแนวโน้มใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์อีกด้วย (Van den Bogaard and Stobberingh, 2000) พบว่ายาปฏิชีวนะหลายชนิดสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์บกและสัตว์น้ำได้ดี (Wierup, 2001; Phillips, et al., 2004) อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะในทางเกษตรกรรมและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกันอย่างกว้างขวางทำให้เกิดเชื้อโรคที่ดื้อยาขึ้น เนื่องจากยีนดื้อยาของเชื้ออยู่บนพลาสมิด (plasmid) ของแบคทีเรียและสามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียอื่น ๆ ได้โดยเฉพาะเชื้อที่ก่อโรคเมื่อมีโรคติดเชื้อที่ดื้อยากับคนหรือสัตว์ทำให้การใช้ยาปฏิชีวนะรักษาโรคไม่ได้ผล ซึ่งจะเป็นอันตรายและเกิดความเสียหายขึ้นอย่างมากทั้งในทางการแพทย์และทางเกษตรกรรม (Schwarz et al., 2001; Akinbowale et al., 2006) ปัญหาของเชื้อดื้อยาเห็นได้ชัดในอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งทั่วโลกโดยเฉพาะอุตสาหกรรมเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย

เนื่องจากการเพาะเลี้ยงกุ้งกันเป็นจำนวนมาก มีการใช้ยาปฏิชีวนะที่ไม่ถูกวิธีหรือใช้มากเกินไปจนความจำเป็น ทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาและไม่สามารถรักษาโรคติดเชื้อด้วยยาปฏิชีวนะได้ ทำให้อุตสาหกรรม การเลี้ยงกุ้งต้องขาดทุนจำนวนมาก (Karunasagar et al., 1994; Moriarty, 1999) พบว่าผลผลิตกุ้ง ของไทยลดลงประมาณ 40% จากปี พ.ศ. 2537 ถึง พ.ศ. 2543 เนื่องจากการระบาดของเชื้อ แบคทีเรียและเชื้อไวรัสในกุ้ง จากผลของอันตรายที่เกิดจากเชื้อที่ดื้อยาปฏิชีวนะทำให้องค์กร และ ประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก เช่น สหภาพยุโรป (EU) ประเทศสหรัฐอเมริกาได้ออกกฎหมายในการใช้ยา ปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์อย่างเข้มงวด (Delsol et al., 2005; Nawaz et al., 2001) สหภาพยุโรปได้ ออกกฎหมายห้ามใช้ยาปฏิชีวนะหลายชนิด เช่น avoparcin, virginiamycin, spiramcin, tylosin และ bacitracin ผสมลงในอาหารสัตว์เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์ (Delsol et al., 2005) ใน ประเทศไทยมีการห้ามใช้ chloramphenicol ในการเลี้ยงสัตว์ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 แต่พบว่าสหภาพ ยุโรปตรวจพบยาปฏิชีวนะนี้ในสัตว์น้ำที่นำเข้าจากประเทศไทย เป็นผลให้สหภาพยุโรปต้องยกเลิก การนำเข้ากุ้งจากประเทศไทยเป็นการชั่วคราว (Heckman, 2004) เนื่องจากปัญหาการดื้อยาของเชื้อ แบคทีเรียดังที่กล่าวแล้ว ปัจจุบันผู้ประกอบการปศุสัตว์หรือการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้หันมาใช้ เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติก (probiotic) มาทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์ และกำลัง เป็นที่นิยมกันมากขึ้นเรื่อย ๆ (Veseeharan and Ramasamy, 2003)

คำว่าโพรไบโอติก (probiotic) เป็นคำมาจากภาษากรีก แปลว่าเพื่อชีวิต (for life) (Gismondo et al., 1999) มีคนให้คำจำกัดความของคำว่าโพรไบโอติกมากมายแต่ที่นิยมนำมาอ้างถึงคือคำจำกัด ความของ Fuller (1989) มีใจความว่า โพรไบโอติกคือ “เชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเสริมกับอาหารและมี ประโยชน์ต่อเจ้าบ้านโดยทำให้เกิดสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร” (“a live microbial feed supplement that beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance” โดยทั่วไปแล้วประโยชน์ของโพรไบโอติกคือช่วยปรับสภาพสมดุลของเชื้อประจำถิ่นใน ทางเดินอาหาร ยับยั้งเชื้อก่อโรค ช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน และช่วยสร้างสารอาหารที่มีประโยชน์ กับร่างกาย (Vaughan et al., 2002) ปัจจุบันนี้คนนิยมบริโภคโพรไบโอติกในรูปของผลิตภัณฑ์อาหาร สุขภาพ (functional food) กันเป็นจำนวนมากเพื่อการมีสุขภาพที่ดี และนิยมนำโพรไบโอติกมาใช้ ป้องกันหรือรักษาโรคในสัตว์ และช่วยเร่งการเจริญเติบโตในสัตว์ (Sullivan and Nord, 2002; Senok et al., 2005)

ในการค้นหาเชื้อโพรไบโอติกสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มีบางส่วนที่ต้องคำนึงถึงคือ สัตว์น้ำมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสิ่งแวดล้อมคือน้ำ ซึ่งเชื้อก่อโรคที่อยู่ในน้ำสามารถเข้าไปสู่ร่างกาย ของสัตว์และเพิ่มจำนวนในตัวสัตว์ได้โดยตรง เชื้อสามารถเข้าสู่ร่างกายสัตว์ได้จากการกินอาหารและ การหายใจผ่านเหงือกอยู่ตลอดเวลา (Hansen and Olafsen, 1999; Verschueren et al., 2000) ซึ่ง ความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์กับสิ่งแวดล้อมรอบตัวจะมีความแตกต่างกับสัตว์น้ำ ดังนั้นจึงได้มีการ

ปรับปรุงคำจำกัดความของคำว่าโพรไบโอติกเสียใหม่เพื่อให้เหมาะกับการนำมาใช้กับสัตว์น้ำ Verschuer และ คณะ (2000) ได้เสนอว่าโพรไบโอติกคือ “เชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เป็นตัวเสริมทำให้เกิดประโยชน์ต่อเจ้าบ้านโดยเข้าไปจัดการสภาพความเป็นอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ในตัวเจ้าบ้านและสิ่งแวดล้อม ปรับปรุงและส่งเสริมอาหารให้มีคุณค่ายิ่งขึ้น เพิ่มการตอบสนองของเจ้าบ้านต่อเชื้อก่อโรค หรือไปพัฒนาสภาพแวดล้อมให้ดีขึ้น”

ได้มีการศึกษาเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria) และนำเชื่อนี้มาใช้เป็นโพรไบโอติกในคนและสัตว์มาช้านาน พบว่าเชื้อแลคติกแอซิดบางสายพันธุ์สามารถพบได้ในทางเดินอาหารของสัตว์น้ำที่มีสุขภาพดี (Ringø and Gatesoupe, 1998; Hagi et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีเชื้ออื่น เช่น เชื้อบาซิลลัส (*Bacillus* spp.) และเชื้อยีสต์ ก็นิยมนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในสัตว์น้ำ บาซิลลัสเป็นเชื้อที่สร้างสปอร์ มีความสามารถในการยึดเกาะได้ดี สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อก่อโรคคือ แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งเป็น เปปไทด์ และเชื่อนี้ยังช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้อีกด้วย (Barbosa et al., 2005) พบว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกของเชื้อบาซิลลัสสามารถเพิ่มผลผลิตของการเลี้ยงกุ้งได้ดีเทียบเท่ากับการใช้ยาปฏิชีวนะ (Decamp and Moriarty, 2006) และยังมีการนำเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มาใช้ในการศึกษาความสามารถในการเพิ่มภูมิคุ้มกันและผลิตสารยับยั้งเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำด้วยเช่นกัน (Van der Aa Kühle et al., 2005)

มีงานวิจัยที่ได้แสดงให้เห็นว่า เชื้อโพรไบโอติกมีผลต่อสัตว์น้ำในด้านต่าง ๆ เช่น ช่วยผลิตเอนไซม์ในการย่อยอาหาร เพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน แย่งเชื้อก่อโรคจับกับรีเซพเตอร์ (receptor) ในทางเดินอาหาร หรือแย่งอาหารกับเชื้อก่อโรค จากการศึกษาของ Baijagi และ คณะ (2004) พบว่าเมื่อให้เชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus circulans* ลงในอาหารปลาที่มีไบโอฟีซเป็นส่วนประกอบเพื่อเลี้ยงปลา *Labeo rohita* พบว่าทำให้เชื้อบาซิลลัสในทางเดินอาหารของปลาเพิ่มขึ้น การเจริญเติบโตของปลาเพิ่มขึ้น อัตราการเปลี่ยนแปลงสารอาหาร (feed conversion ratio) ก็เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งผู้วิจัยได้อธิบายว่าอาจจะเป็นเพราะบทบาทของเอนไซม์ย่อยเซลลูโลส (cellulolytic enzyme) และ เอนไซม์ย่อยแป้ง (amylolytic enzyme) ที่เชื่อนี้ปล่อยออกมาออกเซลล์ การศึกษาการแย่งกันจับรีเซพเตอร์ของเชื้อโพรไบโอติกกับเชื้อก่อโรค มีข้อมูลสนับสนุนจากการทำวิจัยจำนวนมาก Vine และ คณะ (2004) ได้ทำการทดลองใช้เชื้อโพรไบโอติก 5 สายพันธุ์กับเชื้อก่อโรค 2 สายพันธุ์แย่งจับกับรีเซพเตอร์ที่เมือกในทางเดินอาหารของปลา พบว่าเมื่อมีเชื้อโพรไบโอติกยึดเกาะอยู่ที่เมือกของปลาอยู่ก่อน จะสามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานที่แสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติกสามารถแย่งอาหารและแหล่งพลังงานกับเชื้อก่อโรคได้ดี ทำให้เชื้อก่อโรคถูกยับยั้งหรือถูกกำจัดไป (Rico-Mora et al., 1998; Verschuer et al., 1999) เชื้อโพรไบโอติกยังช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ จากการศึกษาของ Itami และ คณะ (1998) ได้นำเปปติโดไกลัยแคน (peptidoglycan) ที่สกัดได้จากเชื้อ *Bifidobacterium thermophilum* มาให้กุ้ง Kuruma กิน แล้วใส่เชื้อโรค *Vibrio penaeicida*

ลงไป พบว่าสามารถเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของกุ้งได้ ซึ่งผู้ทำการทดลองได้อธิบายว่ามีสาเหตุมาจากเปปติโดกลัยแคนไปกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้ง ทำให้เซลล์แกรนูโลซัย (granulocytes) มีจำนวนเพิ่มขึ้นและเพิ่มอัตราการจับกินเชื้อโรคได้มากกว่าเซลล์แกรนูโลซัยของกุ้งที่ไม่ได้รับเปปติโดกลัยแคน

นอกจากนี้มีการทดลองใส่เชื้อโพรไบโอติกลงในถังพักไข่ของปลาทะเล พบว่าอัตราการรอดของตัวอ่อน ขนาดและการเจริญเติบโตของตัวอ่อนจะดีกว่าไข่ที่ไม่ได้ใส่โพรไบโอติก ไข่ปลาที่พักรวมกับโพรไบโอติกจะมีเชื้อแบคทีเรียอื่นมาเจริญที่ไข่ปลาและแย่งอาหารได้น้อยกว่าไข่ที่ไม่มีโพรไบโอติก (Kennedy et al., 1998) Gilberg และ คณะ (1997) ได้นำเชื้อ *Carnobacterium divergens* ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกมาจากทางเดินอาหารของคนมาให้ปลา cod fry กิน แล้วใส่เชื้อโรค *Vibrio anguillarum* ลงไป พบว่าปลาสามารถเพิ่มความต้านทานต่อเชื้อโรคได้ดี และเมื่อสิ้นสุดการทดลองปลาที่มีชีวิตรอดจะมีเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียเจริญอยู่ในทางเดินอาหารจำนวนมาก Veseeharan และ Ramasamy (2003) ได้ศึกษาการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Panaeus monodon*) โดยให้กุ้งกินเชื้อบาซิลลัส จากผลที่ได้ผู้วิจัยได้ให้ความเห็นว่าการใช้เชื้อบาซิลลัสในการเลี้ยงกุ้งสามารถทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะได้ และการศึกษาของ Rengpipat และ คณะ (2003) โดยให้กุ้งกุลาดำกินอาหารเสริมที่มีเชื้อโพรไบโอติกบาซิลลัส (BS11) พบว่ากุ้งที่ได้รับโพรไบโอติกจะมีอัตราการรอดชีวิตและอัตราการเจริญเติบโตได้ดีกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก

แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria)

แลคติกแอซิดแบคทีเรีย เป็นเชื้อแกรมบวก (Gram-positive) ไม่เคลื่อนที่และไม่สร้างสปอร์ พบได้ในอาหารหมักดองและผลิตภัณฑ์นม ซึ่งการใช้เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียมาผลิตนมเปรี้ยวหรือโยเกิร์ตเพื่อใช้เป็นอาหารมีมาเป็นเวลานานนับพันปี แลคติกแอซิดแบคทีเรียจัดเป็นเชื้อในกลุ่มที่ปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS) นอกจากนี้เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียยังเป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ในทางเดินอาหารและในช่องคลอดของคน ในทางเดินอาหารของสัตว์ และในพืช เชื้อในกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลบางชนิดให้ได้กรดแลคติก (lactic acid) เชื้อในกลุ่มนี้มีหลายชนิด ได้แก่ *Lactobacilli*, *Pediococci*, *Bifidobacteria* และ *Enterococci* มีเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกมาใช้เป็นโพรไบโอติกในคนและสัตว์ เช่น *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* และมีการใช้เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำซึ่งได้ผลดี (Verschuere et al., 2000)

บาซิลลัสสปิซิส (*Bacillus spp.*)

แบคทีเรียในจินัสบาซิลลัส เป็นเชื้อแกรมบวก (Gram-positive) รูปแท่ง พบได้ในดิน เชื้อบางสายพันธุ์ได้รับการคัดเลือกมาใช้เป็นโพรไบโอติกของสัตว์ (Alexopoulos et al., 2004) เนื่องจากเชื้อบาซิลลัสสามารถสร้างสปอร์ได้ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดและทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี และสามารถนำมาเตรียมให้อยู่ในรูปของอาหารสัตว์ได้ง่าย ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อสามารถทำให้เชื้อผลิตสปอร์ได้ในปริมาณที่สูง ได้ผลิตภัณฑ์ของเชื้อที่มีคุณภาพดี เมื่อกินสปอร์ของเชื้อเข้าไปสปอร์สามารถเจริญเป็นตัวเซลล์ มีการนำเชื้อ *Bacillus subtilis* มาใช้เป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และสัตว์บกเพื่อใช้ป้องกันและรักษาโรค (Farzanfar, 2006) เนื่องจากเชื้อบาซิลลัสไม่สร้างโคโลนีในทางเดินอาหารจึงจัดเป็นเชื้อในกลุ่ม transient flora เชื้อบาซิลลัสมีศักยภาพสูงที่สามารถช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันในทางเดินอาหารได้ดี (Sanders et al., 2003) การงอกของสปอร์ของเชื้อบาซิลลัสจะเกิดขึ้นในที่ที่มีอาหาร น้ำ อุณหภูมิ และ pH ที่พอเหมาะ สปอร์ของเชื้อบาซิลลัสที่ใช้เป็นโพรไบโอติกควรงอกเป็นตัวเซลล์ได้ดีในทางเดินอาหารของสัตว์ ขณะที่มีการงอกของสปอร์จะมีกระบวนการเมตาบอลิซึมเกิดขึ้นมากมาย สารที่หลั่งออกมาจากการงอกของสปอร์จะมีผลยับยั้งเชื้อก่อโรคได้

เชื้อก่อโรคในปลาและเชื้อโพรไบโอติกที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย

Aeromonas hydrophila

เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง สร้างเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase positive) และทดสอบอินโดลให้ผลบวก (indole positive) เคลื่อนที่โดยใช้ polar flagella พบในภูมิอากาศแถบร้อน เจริญที่อุณหภูมิต่ำได้ (4 °C) อาศัยอยู่ในปลาน้ำจืด หรือน้ำกร่อย สามารถมีชีวิตอยู่ได้ทั้งในสภาพ aerobe และ anaerobe ย่อยเจลาติน และฮีโมโกลบินได้ สามารถทนต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด *A. hydrophila* เป็นโรคของปลาและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Hazen et al., 1978) และเป็นเชื้อก่อโรคในคน เป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจมากในการเลี้ยงปลาดุก ปลานิล กบ และปลาน้ำจืดอื่น ๆ มักจะพบบ่อยในบ่อที่เลี้ยงให้อาหารสด หรือเลี้ยงแบบผสมผสาน เชื้อนี้จะอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ โดยเฉพาะแหล่งน้ำที่มีสารอินทรีย์สูง ความเครียดที่เกิดจากความหนาแน่นในการเลี้ยง การขนส่งปริมาณออกซิเจนที่ต่ำ การให้อาหารที่ไม่ดี ล้วนเป็นสาเหตุเหนี่ยวนำให้ปลาติดเชื้อ อาการที่แสดง ออก และลักษณะรอยโรคมีความหลากหลาย แต่อาการที่ปรากฏร่วมกันในการติดเชื้อแต่ละ serotype คือ อาการมีเลือดออก (hemorrhage) ที่ผิวหนัง ช่องปาก และกล้ามเนื้อซึ่งมักเกิดร่วมกับการมีแผลหลุมที่ชั้น epidermis บางครั้งอาจพบลักษณะเป็นแผลหลุมลึก (furunculosis) เหมือนกับรอยโรคที่เกิดจาก *A. salmonicida* นอกจากนี้มักพบอาการตาโปน (exophthalmus) และ ท้องมาร (ascites) ได้ อาการอื่น ๆ ที่อาจพบได้แก่ อาการ เกล็ดตั้ง ท้องกาง ครีบเปื่อย (fin rot) เมื่อผ่าซากจะพบม้ามโต ไตบวม และเมื่อทำการตรวจอวัยวะต่างๆ ของสัตว์ที่ติดเชื้อทางจุลพยาธิวิทยา มัก

พบจุดเนื้อตาย หลายบริเวณที่ม้าม ตับ ไต และหัวใจ ซึ่งจะพบไปพร้อม ๆ กับการปรากฏของแบคทีเรียรูปแท่ง ชื่อ *A. hydrophila* สามารถติดต่อกันได้โดยทำให้เกิดอาการต่างๆ ในคนได้แก่ myonecrosis, cellulitis และ ecthyma gangrenosum (ชนกันต์ จิตมนัส, 2556)

Streptococcus agalactiae

เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม มักเรียงตัวต่อกันเป็นสายโซ่ สามารถ สร้างสารพิษเบตาฮีโมไลซิน (beta hemolysin) ทำลายเม็ดเลือดแดงได้ ชนิดของสัตว์น้ำที่ติดเชื้อได้ ทั้งปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม จะพบโรคมามากใน ปลานิล (tilapia) ปลา hybrid striped bass และปลา rainbow trout อาการและรอยโรค เป็นอาการของโรคจากการที่มีภาวะติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด หลังจากนั้นในรายติดเชื้อเรื้อรัง (chronic form) ส่วนใหญ่จะพบอาการของระบบประสาท (central nervous system) เนื่องจากเป็นบริเวณที่เชื้อเข้าไปรุกรานโดยส่วนใหญ่ อาการเฉียบพลัน (acute) ของการติดเชื้อในกระแสเลือดได้แก่การมีจุดหรือปื้นเลือดออกที่ครีบท่าง ๆ ผิวหนัง และ serosal surface บางครั้งอาจพบแผลหลุม (ulcer) ได้ ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาจะพบ meningoencephalitis, polyserositis, epicarditis, myocarditis และ cellulitis นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียรูปร่างกลมจำนวนมากที่บริเวณต่าง ๆ ดังกล่าวด้วย ในรายเรื้อรังมักพบ granulomas หรือ granulomatous มีงานวิจัยหลายชิ้นที่กำลังพัฒนาวัคซีนเพื่อป้องกันโรคติดเชื้อชนิดนี้ นิลบล กิจอันเจริญ และ คณะ (2549) ทดลองใช้วัคซีนเชื้อตายกับปลานิลที่เลี้ยงไว้ในกระชังในแม่น้ำชี จ. มหาสารคาม พบว่าปลาที่ได้รับวัคซีนมีอัตราการตายต่ำกว่าปลาที่ไม่ได้รับวัคซีน

***Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103**

L. rhamnosus GG แยกครั้งแรกจากอุจจาระของคนสุขภาพดีโดย S. Gorbach และ Goldin ในปี ค.ศ. 1985 (Gorbach, 2000) และจากการศึกษาพบว่าใช้รักษาผู้ป่วย colitis ได้ผลดี (Gorbach et al., 1987) สามารถสร้างโคโลนีในทางเดินอาหารของสัตว์ฟันแทะได้ (Banasaz et al., 2002) และทางเดินอาหารของคน (colonic mucosa) (Alander et al., 1999) การเกาะของเชื้อที่ mucosa ทำให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันให้สร้าง mucosal IgA และทำให้เกิดการ uptake antigen ที่ Payer's Patches (Gorbach, 2000) *L. rhamnosus* GG เป็นเชื้อโพรไบโอติกที่ได้รับการศึกษาทางคลินิกอย่างแพร่หลาย เชื้อนี้สามารถเกาะกับเซลล์ในทางเดินอาหารของคน และสามารถอยู่ในทางเดินอาหารของคนสุขภาพดีได้นานกว่า 1 สัปดาห์เมื่อได้รับเชื้อโดยการกิน (Alader et al., 1999) สามารถสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวที่ไม่ใช่พื้นผิวชีวภาพ เช่น polystyrene ซึ่งคุณสมบัติต่าง ๆ จะมีผลมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่ใช้ และสภาวะของทางเดินอาหาร เช่น pH ความดันออสโมติกที่สูง การมีหรือไม่มีน้ำดี หรือ มิวซิน (mucin) ร่วมด้วย เชื้อสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้เมื่อเลี้ยงใน de

Man Rogosa and Sharpe broth (MRSB) ที่ไม่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อมีมิวซินร่วมด้วยความสามารถในการเกาะจะเพิ่มขึ้นถึง 20% ในทางตรงกันข้ามถ้าอยู่ใน pH ที่ต่ำจะลดการสร้างไบโอฟิล์ม (Lebeer et al., 2007) นอกจากนี้เชื้อตัวอื่น เช่น *L. rhamnosus* 183 ที่แยกมาจากนมเมื่อนำมาเลี้ยงใน MRSB สามารถสร้างไบโอฟิล์มบนผิว polystyrene ได้ และสามารถยับยั้งการเกาะของเชื้อโรค คือ *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. ได้ดี (Bujnakova and Kmet, 2012)

เพลเลต (Pellet)

ในการนำส่งเชื้อโปรไบโอติกให้ปลานั้นนิยมให้เชื้อรวมไปกับอาหาร โดยเตรียมอาหารผสมกับเชื้อโปรไบโอติกแล้วเตรียมให้อยู่ในรูปของเพลเลตเพื่อให้ปลากิน ซึ่งปลาจะได้รับอาหารและได้รับโปรไบโอติกไปพร้อมกัน เพลเลตหมายถึง มวลอนุภาคที่จับกลุ่มกัน มีรูปร่างค่อนข้างกลมหรือกลม เตรียมจากสารเคมีหลากหลาย และมีการใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ตัวอย่างเพลเลต ได้แก่ ปู๋ อาหารสัตว์ ยาเพลเลต เป็นต้น ในทางทางเภสัชกรรม เพลเลตหมายถึงอนุภาคกลม ซึ่งมีขนาดระหว่าง 200 ไมโครเมตร ถึง 2 มิลลิเมตร

การเตรียมเพลเลตมีหลายวิธี วิธีที่ได้รับความนิยมในอุตสาหกรรมคือ วิธีกลิ้งให้กลม วิธีอัดให้เป็นเส้นนำมาตัดแล้วทำให้กลม โดยใช้เครื่อง spheronizer นอกจากนี้สามารถเตรียมเพลเลตด้วยวิธีพ่นแห้ง (spray dry) และแช่เยือกแข็ง (lyophilization) สำหรับเพลเลตที่ใช้เป็นอาหารปลา มีทั้งชนิดจมน้ำและชนิดลอยน้ำ โดยชนิดลอยน้ำ เรียกว่า floating pellet จากการศึกษาของ Wiwattanapatapee และคณะ (2004) พบว่าส่วนประกอบสำคัญที่ทำให้เพลเลตมีคุณสมบัติลอยน้ำได้คือ hydrogenated vegetable oil (HVO) เนื่องจากน้ำมันพืชมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) และมีความหนาแน่นต่ำกว่าน้ำ (0.57 กรัม/มิลลิลิตร) และใช้ microcrystalline cellulose เป็นสารก่อเพลเลต จากการศึกษาของ Solomon และคณะ (2011) ได้ทำให้เพลเลตลอยน้ำโดยการใส่ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ลงในสูตรอาหารปลาเพื่อให้เกิดการหมักของยีสต์กลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ระหว่างกระบวนการผลิต เกิดเป็นรูพรุนภายในเพลเลตส่งผลให้เพลเลตลอยน้ำได้

การคัดเลือกเชื้อสำหรับใช้เป็นโปรไบโอติก

ทั้งเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียและเชื้อบาซิลลัสมีสายพันธุ์ของเชื้ออยู่ในแต่ละกลุ่มเป็นจำนวนมาก แต่มีเชื้อเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถแสดงคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่ดีได้ ดังนั้นจึงต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อที่เหมาะสม เชื้อที่ใช้เป็นโปรไบโอติกนั้นจะต้องเจริญเติบโตได้ดีในทางเดินอาหารของสัตว์และถ้าเป็นสัตว์น้ำเชื้อจะต้องเจริญได้ดีในน้ำที่เป็นที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำเหล่านั้นด้วย หลักการในการเลือกเชื้อเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกได้แก่

- สามารถผลิตสารที่ใช้ยับยั้งเชื้อก่อโรค เช่น กรดแลคติก กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acids) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และสารประเภทโปรตีนคือแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งสารเหล่านี้จะมีความสามารถในการทำลายเชื้อโดยตรงหรือไปทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น ทำให้มี pH ต่ำมากจนเชื้อก่อโรคเจริญเติบโตไม่ได้ (Verschuere et al., 2000; Irianto and Austin, 2002)

- ทำให้เกิดประโยชน์กับสัตว์อย่างใดอย่างหนึ่ง เช่น ช่วยกระตุ้นทำให้สัตว์เจริญเติบโตได้ดี โดยการสร้างสารอาหาร วิตามิน เช่น ไบโอติน (biotin) วิตามินบี 12 ช่วยยับยั้งเชื้อก่อโรคทำให้สัตว์มีสุขภาพดี หรือช่วยเสริมระบบภูมิคุ้มกันทำให้สัตว์สามารถต้านทานโรคติดเชื้อได้ดี (Fuller, 1992; Irianto and Austin, 2002)

- สามารถมีชีวิตรอดและเจริญเติบโตในทางเดินอาหารของสัตว์น้ำได้เป็นเวลายาวนานพอที่จะแสดงคุณสมบัติของโพรไบโอติกที่ดี (Verschuere et al., 2000)

- มีความสามารถในการยึดเกาะกับทางเดินอาหารของสัตว์น้ำได้ดี เชื้อที่ยึดเกาะได้ก็จะทำให้สามารถสร้างโคโลนีขึ้นในทางเดินอาหาร เชื้อเจริญเพิ่มจำนวนครอบคลุมผนังลำไส้ทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถยึดเกาะที่ผนังลำไส้ได้ และถูกกำจัดออกไป (Fuller, 1992; Jöborn et al., 1997; Nikoskelainen et al., 2001).

- เมื่อเตรียมเชื้อให้อยู่ในรูปของผลิตภัณฑ์เพื่อให้กับสัตว์ เชื้อควรมีชีวิตรอดได้ในขณะผ่านกระบวนการผลิต ในระหว่างที่เก็บ ระหว่างการขนส่ง และในขณะที่นำไปใช้ (Fuller, 1992)

- เชื้อโพรไบโอติกจะต้องไม่เป็นเชื้อที่ก่อโรคหรือมีพิษ ต้องไม่เป็นแหล่งของยีนที่ดื้อยาที่อาจจะแพร่กระจายยีนดื้อยาไปให้เชื้อก่อโรค และไม่มีผลข้างเคียงกับสัตว์ที่ได้รับโพรไบโอติกนั้น (Fuller, 1992).

- เชื้อที่ใช้เป็นโพรไบโอติกควรแยกได้จากสัตว์ชนิดเดียวกันหรืออยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกันกับสัตว์ที่จะเอาโพรไบโอติกไปใช้ เนื่องจากเชื้อโพรไบโอติกจะเจริญได้ดีในสภาพที่เชื้อเคยอยู่แต่เดิม (Alvandi et al., 2004) อย่างไรก็ตามการใช้เชื้อโพรไบโอติกกับสัตว์ที่ไม่ใช่แหล่งที่มาของเชื้อก็มีผู้นิยมนำมาใช้มากขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งจะต้องพิสูจน์ว่าเชื่อนั้นยังคงแสดงคุณสมบัติของการเป็นโพรไบโอติกที่ดีได้

ป่าพรุโต๊ะแดง (Tou Dang peat swamp forest)

ป่าพรุโต๊ะแดง เป็นป่าพรุแหล่งสุดท้ายที่เหลืออยู่ในประเทศไทย มีอาณาเขตติดสามอำเภอของจังหวัดนราธิวาส คืออำเภอตากใบ อำเภอสุไหงโกกลก และอำเภอสุไหงปาดี มีพื้นที่ทั้งหมดประมาณ 192 ตารางกิโลเมตร ในบริเวณตรงกลางป่าพรุมีลักษณะเป็นป่าที่บดเป็นพื้นที่ประมาณ 80 ตารางกิโลเมตร ป่าพรุมีลักษณะเป็นพื้นที่ต่ำมีน้ำจืดขังอยู่มีต้นไม้ขึ้นอยู่หนาแน่น มีซากต้นไม้

ใบไม้ ดินทับถมกันเป็นเวลายาวนาน เกิดกระบวนการตามธรรมชาติทำให้ดินกลายเป็นถ่านดินเลน (peat) ที่อุดมไปด้วยสารอินทรีย์ มีลักษณะนุ่มสามารถซับน้ำได้ดี เนื่องจากบริเวณนี้อยู่ใกล้ทะเลในบางช่วงในสมัยโบราณจะมีน้ำเค็มจากทะเลเข้ามาขังอยู่ และทำให้เกิดเป็นป่าชายเลน เมื่อน้ำทะเลแห้งไปก็จะมีน้ำจืดมาขังแทนต้นไม้ป่าชายเลนก็ตายทับถมกัน โครงสร้างของดินในป่าพรุแห่งนี้จึงมีลักษณะเป็นชั้น 2-3 ชั้นสลับกันระหว่างถ่านดินเลนและตะกอนดินจากทะเล ดินส่วนล่างที่อยู่ลึกมีอายุประมาณ 6,000-7,000 ปี ดินที่ผิวหน้าจะมีอายุประมาณ 700-1,000 ปี ป่าชายเลนเป็นระบบนิเวศที่อุดมสมบูรณ์และมีความซับซ้อน มีพืชและสัตว์อาศัยอยู่จำนวนมาก ต้นไม้มีรากที่แข็งแรง งามแผ่กระจายไปประสานกับรากของต้นอื่น ทำให้ช่วยพยุงลำต้นที่มีขนาดใหญ่ให้อยู่ในดินโคลนและน้ำขังได้ดี ทำให้ต้นไม้ในป่าพรุขึ้นรวมกันเป็นกลุ่ม ๆ เมื่อต้นไม้ต้นหนึ่งล้มก็จะดึงเอาต้นอื่น ๆ ที่อยู่ใกล้เคียงล้มลงไปด้วย จากการสำรวจพบว่าในป่าพรุโต๊ะแดงมีพันธุ์ไม้ประมาณ 109 วงศ์ จำนวน 450 ชนิด พืชไร้ดอกจำพวกเฟิร์นประมาณ 15 วงศ์ จำนวน 40 ชนิด พืชมีดอก เช่น ปาหนันช้าง (*Goniothalamus giganteus*), หลุมพี (*Eleiodoxa conferta*) และกะป้อแดง (*Licuala paludosa*) พบสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด บางชนิดเป็นสัตว์ที่หายากใกล้สูญพันธุ์ เช่น เสือดำ (*Panthera pardus*), แมวป่าหัวแบน (*Prionailurus planiceps*), กระรอกบินแก้มแดง (*Hylopetes spadiceus*), นากจุกขนิ (*Lutra sumatrana*) เป็นต้น ภายในป่าพบนกอย่างน้อย 217 ชนิด ในจำนวนนี้มีอยู่ 3 ชนิดที่ได้รับการบันทึกว่าเป็นสายพันธุ์ที่กำลังถูกคุกคามและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ได้แก่ นกตะกรุม (*Leptoptilos dubius*), นกฟีนฟุท (*Heliopais personata*) และนกเป่าใหญ่ (*Treron capellei*) พบพันธุ์ปลาที่หายากและพบได้เฉพาะถิ่นในป่าพรุแห่งนี้ เช่น ปลาดุกลำพัน (*Clarias nieuhofii*), ปลากระมัง (*Chaca bankanensis*), ปลาแก้งพระร่วงป่าพรุ (*Kryptopterus macrocephalus*), ปลาเข็มช้าง (*Hemiramphodon pogonog-nathus*), ปลากัดน้ำแดง (*Betta pi*) เป็นต้น (<http://www.thai-tour.com/eng/narathiwat/sirindhorn-peat-swamp-forest/>)

เนื่องจากป่าพรุโต๊ะแดงมีความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวทั้งภูมิศาสตร์และสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ คาดว่าป่าพรุโต๊ะแดงน่าจะเป็นแหล่งของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์อยู่จำนวนมากที่ยังไม่ได้รับการศึกษาค้นคว้า ดังนั้นการค้นหาเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียและเชื้อบาซิลลัส จากทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ ดิน และตะกอนดินจากป่าพรุแห่งนี้เพื่อใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและอาจจะใช้เป็นโพรไบโอติกของคนจึงนับเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่ง

เนื่องจากเห็นว่าขั้นตอนการคัดเลือกเชื้อโพรไบโอติกที่จะใช้ในสัตว์มีวิธีการใกล้เคียงกันกับการคัดเลือกเชื้อโพรไบโอติกที่ใช้ในคน ดังนั้นโครงการนี้จึงขยายงานเพิ่มขึ้นบางส่วนเพื่อคัดแยกเฉพาะเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียซึ่งอาจจะมีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในทางเดินอาหารและในช่องคลอดของคน ในการเลือกเชื้อสำหรับใช้ในคนนั้นมุ่งเน้นเชื้อที่สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมในทางเดินอาหารได้ดี สามารถยึดเกาะและเจริญเติบโตและออกฤทธิ์ในทางเดินอาหารเพื่อ

ยับยั้งเชื้อก่อโรค ขณะเดียวกันเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย เช่น *Lactobacillus* spp. ก็เป็นเชื้อประจำถิ่นในช่องคลอดของคนซึ่งจะคอยควบคุมเชื้อก่อโรคต่าง ๆ ในช่องคลอดไว้ ในบางสภาวะเมื่อเชื้อกลุ่มนี้ลดลง ทำให้เชื้อก่อโรคเจริญเติบโตขึ้นส่งผลให้เกิดการติดเชื้อในช่องคลอด ปัจจุบันนี้นอกจากจะรักษาโรคติดเชื้อในช่องคลอดด้วยยาปฏิชีวนะแล้วยังมีการให้โพรไบโอติกเพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อคัดแยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยเฉพาะ *Lactobacillus* spp. และเชื้อบาซิลลัส สปีชีส์จากทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ ดิน และตะกอนตมที่ได้จากป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของเชื้อ *Lactobacillus* spp. และเชื้อบาซิลลัส สปีชีส์ เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกของเชื้อ *Lactobacillus* spp. และเชื้อบาซิลลัส สปีชีส์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่อาจจะนำไปใช้เป็นโพรไบโอติกในคนได้

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ศึกษา และสภาวะในการเพาะเลี้ยง

เชื้อก่อโรคในปลา *Aeromonas hydrophila* เชื้อที่ 1, 2 และ *Streptococcus agalactiae* เชื้อที่ 1, 2 (แยกได้จากแหล่งของเชื้อที่ต่างกัน) ได้รับความอนุเคราะห์จาก นางสาวเจนจิตต์ คงกำเนิด ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา อ.เมือง จ.สงขลา *Aeromonas hydrophila* เชื้อที่ 3 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.นเรศ ชวนยุก หัวหน้าศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำกักการศุภมาตย์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อคือ brain heart infusion broth (BHIB) (Dfco, USA) หรือ brain heart infusion agar (BHIA) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C, 24-48 ชม.

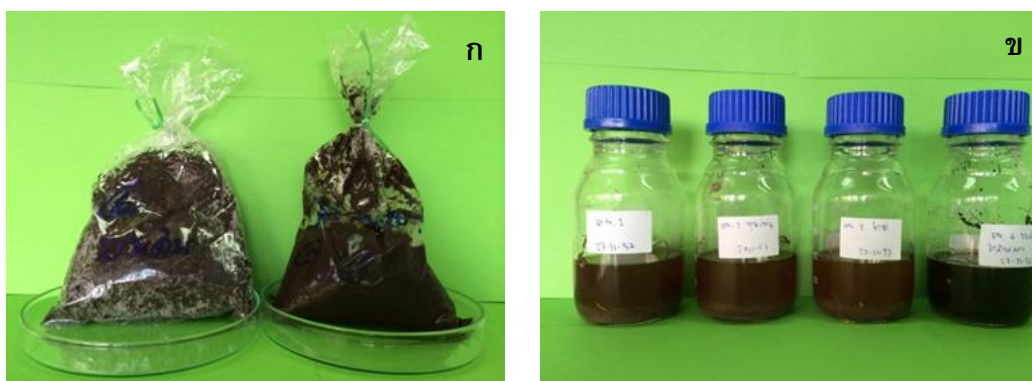
เชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารและเชื้อก่อโรคในช่องคลอดของคน ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* และเชื้อก่อโรคในช่องคลอด ได้แก่ *Gardnerella vaginalis* ได้จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อคือ BHIB (Dfco, USA) บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C, 24-48 ชม.

Lactobacillus rhamnosus GG (ATCC 53103) ชื้อมาจาก American Type Culture Collection (ATCC) (P.O.Box 1549, Manssas, VA 20108-1549, 703-365-2007 FAX: 703, email: sale@atcc.org) อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อคือ de Man Rogosa and Sharpe broth (MRSB) หรือ de Man Rogosa and Sharpe agar (MRSA) ในสภาวะ anaerobe โดยเลี้ยงเชื้อใน anaerobic jar ที่ใส่ Anaerocult[®] (Merck, Germany) เพื่อทำให้เกิดสภาวะ anaerobe บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C, 24-48 ชม.

2. การเก็บตัวอย่างดิน ตะกอนตม และสัตว์น้ำ จากป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส

วิธีเก็บตัวอย่างดินและตะกอนตม

เก็บตัวอย่างดินและตะกอนตม มาจากป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส การเก็บตัวอย่างดินที่อยู่เหนือน้ำ จะใช้พลั่วตักดิน ส่วนดินที่เป็นตะกอนตมจะใช้เครื่องมือสำหรับตักดินใต้น้ำ โดยเก็บตัวอย่างดินมาจตุลประมาณ 500 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก เก็บในกล่องโฟมแช่น้ำแข็ง ส่งตัวอย่างดินทั้งหมดไปยังห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา เพื่อทำการเตรียมตัวอย่างดิน ดังแสดงในรูปที่ 2.1 และแยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยเฉพาะเชื้อในจีส *Lactobacillus* และเชื้อในจีส *Bacillus* ทันที



รูปที่ 2.1 ตัวอย่างดิน (ก) และการเตรียมตัวอย่างดิน (ข)

วิธีเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำ

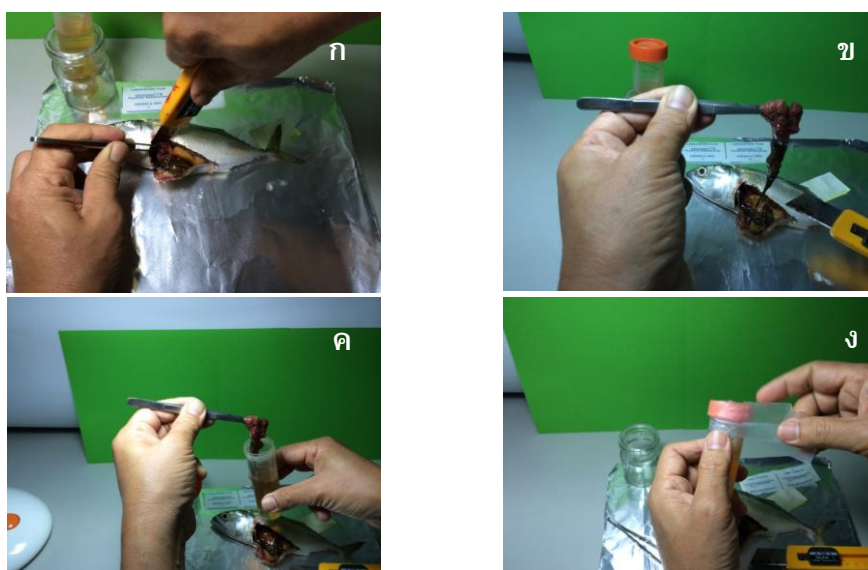
นำสัตว์น้ำที่จับได้จากป่าพรุโต๊ะแดง ประกอบด้วย ปลา กุ้ง หอย ที่ยังมีชีวิต เพื่อแยกเชื้อจากทางเดินอาหารของสัตว์เหล่านั้น ทำความสะอาดตัวสัตว์ให้สะอาด นำปลาหรือสัตว์อื่น ๆ มาวางลงบนกระดาษฟอยล์อะลูมิเนียม ใช้สาลีสับแอลกอฮอล์เช็ดมีดคัตเตอร์ กรรไกรและปากคีบเพื่อทำความสะอาด แล้วกรีดที่ท้องของปลาให้เปิดออก ใช้ปากคีบจับที่ทางเดินอาหารของปลาแล้วตัดทางเดินอาหารทั้งหมดนำมาใส่ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRSB สำหรับแยกเชื้อ *Lactobacillus* pp. และใส่ตัวอย่างลงใน BHIB สำหรับแยกเชื้อ *Bacillus* spp. ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ถ้าเป็นสัตว์น้ำขนาดเล็ก เช่น กุ้งจะใส่สัตว์ทั้งตัวลงในอาหาร การเก็บตัวอย่างหอย เปิดฝาหอยออก ดึงลำไส้หอยออกจากเปลือกหอยนำมาใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปิดฝาเกรียวทันทีให้แน่น พันที่ฝาด้วยแผ่นพาราฟิล์มเพื่อป้องกันการรั่วซึมของอาหารเลี้ยงเชื้อ แช่อาหารเลี้ยงเชื้อลงในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็ง ส่งตัวอย่างไปยังห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ที่คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อทำการแยกเชื้อในจีส *Lactobacillus* และเชื้อในจีส *Bacillus* ทันที

3. วิธีแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* spp. จากดิน ตะกอนตม และทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ

วิธีแยก *Lactobacillus* spp. จากดิน

ชั่งตัวอย่างดินมา 50 กรัม ใส่ใน buffered peptone water 450 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วทำ 10-fold serial dilution ด้วย buffered peptone water แล้ว pour plate ด้วย Rogosa agar ซึ่งเป็น selective medium สำหรับ *Lactobacillus* spp. บ่มเพาะเชื้อในสภาวะ anaerobe (ในการทำให้เกิดสภาวะ anaerobe นั้นจะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* spp. ซึ่งอยู่บนอาหารแข็งหรืออาหารเหลวใน

anaerobic jar ที่ใส่ Anaerocult[®] (Merck, Germany) เพื่อทำให้เกิดสภาวะ anaerobe ดังนั้นเมื่อกล่าวถึงการเลี้ยงเชื้อในสภาวะ anaerobe ในการทดลองต่าง ๆ ในลำดับต่อไปจะใช้วิธีการดังกล่าวนี้) ที่อุณหภูมิ 37 °C, 48 ชม. นำเชื้อที่เจริญบน Rogosa agar มา streak ข้างบน MRSA จนได้ isolate colony ที่บริสุทธิ์นำเชื้อมาย้อมแกรม (Gram stain) และทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase test) เลือกเชื้อที่เป็นแกรมบวก รูปแท่ง ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส เบื้องต้นจัดเป็นเชื้อ *Lactobacillus* spp. นำเชื้อมาเลี้ยงต่อใน MRSB บ่มเพาะเชื้อในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. แล้วใส่กลีเซอริน (glycerine) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 20% (v/v) ผสมให้เข้ากันแบ่งใส่หลอด cryotube นำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -80 °C สำหรับไว้ศึกษาในขั้นต่อไป



รูปที่ 2.2 วิธีเก็บตัวอย่างจากทางเดินอาหารของปลา (ก-ง)

วิธีย้อมแกรม (Gram's stain)

หยดน้ำกลั่นลงบนแผ่นสไลด์ ใช้ลูปนำเชื้อไปใส่ที่หยดน้ำ ป้ายเชื้อให้เป็นฟิล์มบาง ๆ วางให้แห้ง แล้วนำแผ่นสไลด์ไปผ่านเปลวไฟเพื่อให้ความร้อนช่วยตรึงเซลล์ให้ติดแน่นอยู่กับแผ่นสไลด์ ทำการย้อมแกรมโดยใช้ชุดสีสำหรับย้อมแกรม หยดสารละลายสี crystal violet ลงบนเชื้อให้ท่วมทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำ แล้วใส่สารละลาย Gram's iodine ลงบนเชื้อ 30 นาที ล้างด้วยน้ำ แล้วล้างด้วย 95% alcohol 10-20 วินาที ล้างด้วยน้ำ หยดสารละลายสี safranin ลงบนเชื้อให้ท่วมทิ้งไว้ 20-30 วินาที ล้างด้วยน้ำ วางให้แห้งก่อนนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 10x100 เท่า แบคทีเรียที่เป็นแกรมบวกจะติดสีม่วงแดง ส่วนแบคทีเรียที่เป็นแกรมลบจะติดสีชมพูแดง

วิธีทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส (Catalase test)

ใช้สำลีพันปลายไม้ นำเชื้อมาป้ายลงบนสไลด์แล้วหยด 3% (v/v) hydrogen peroxide บนเชื้อ ถ้าเชื้อสร้างเอนไซม์คาตาเลสจะให้ฟองก๊าซฟุ้งออกมา แต่ถ้าเชื้อไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลสจะไม่เกิดฟองก๊าซ

วิธีแยกเชื้อ *Bacillus* spp. จากดิน

ชั่งตัวอย่างดินมา 50 กรัม ใส่ใน buffered peptone water 50 มล. แล้วเจือจาง 1:10 ด้วย buffered peptone water แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 80 °C, 10 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่เป็น vegetative cell ให้เหลือแต่สปอร์ที่ทนความร้อนได้ แล้วเจือจางแบบ 10-fold serial dilution ด้วย buffered peptone water แล้ว pour plate ด้วย BHIA บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C, 72 ชม. เพื่อให้สปอร์งอกเป็น vegetative cell แล้วนำมาเลี้ยงใน Difco sporulation medium (DSM) เพื่อให้เชื้อสร้างสปอร์อีกครั้งหนึ่ง โดยบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C, 72 ชม. ทำการย้อมแกรม และย้อมสปอร์ ทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส คัดเลือกเชื้อที่เป็นรูปแท่ง สร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวก สร้างเอนไซม์คาตาเลส เบื้องต้นจัดเป็นเชื้อ *Bacillus* spp. นำเชื้อมาเลี้ยงใน BHIB ที่อุณหภูมิ 37 °C, 72 ชม. แล้วใส่กลีเซอรินลงไปให้อาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 20% (v/v) แบ่งใส่หลอด cryotube นำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -80 °C สำหรับไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

วิธีแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. จากทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ

นำหลอดของอาหาร MRSB ที่ใส่ทางเดินอาหารของสัตว์น้ำไปบ่มเพาะในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C, 48 ชม. แยกทางเดินอาหารของสัตว์น้ำทิ้งไป นำส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำ 10-fold serial dilution ด้วย buffered peptone water แล้ว pour plate ด้วย Rogosa agar บ่มเพาะเชื้อในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C, 48 ชม. นำเชื้อที่เจริญบน Rogosa agar มา streak ขั้วบน MRSA จนได้ isolate colony บริสุทธิ์ นำเชื้อมาย้อมแกรม และทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส เลือกเชื้อที่เป็นแกรมบวก รูปแท่ง ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส เบื้องต้นจัดเป็นเชื้อ *Lactobacillus* spp. นำเชื้อมาเลี้ยงต่อใน MRSB บ่มเพาะเชื้อในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. แล้วใส่กลีเซอรินลงไปให้อาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 20% (v/v) แบ่งใส่หลอด cryotube นำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -80 °C สำหรับเป็นสต็อกเพื่อไว้ศึกษาในขั้นต่อไป ก่อนจะนำเชื้อที่เป็นสต็อกไปใช้ทุกการทดลองที่จะกล่าวถึงในลำดับต่อไปจะนำเชื้อที่เป็นสต็อกมา subculture 2 ครั้งใน MRSB โดยบ่มเพาะในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม.

วิธีแยกเชื้อ *Bacillus* spp. จากทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ

นำหลอดของอาหาร BHIB ที่ใส่ทางเดินอาหารของสัตว์น้ำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C, 48 ชม. แล้วถ่ายเชื้อลงใน DSM เพื่อให้เชื้อที่เป็น *Bacillus* spp. สร้างสปอร์ โดยบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C, 72 ชม. นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 80 °C, 10 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่เป็น vegetative cell ให้เหลือแต่สปอร์ที่ทนความร้อนได้ แล้วเจือจางแบบ 10-fold serial dilution ด้วย buffered peptone water ทำการ pour plate ด้วย BHIA บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C, 72 ชม. เพื่อให้สปอร์งอกเป็น vegetative cell นำเชื้อมาเลี้ยงใน DSM เพื่อให้เชื้อสร้างสปอร์อีกครั้งหนึ่ง โดยบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C, 72 ชม. ทำการย้อมแกรม และย้อมสปอร์ และทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส คัดเลือกเชื้อที่เป็นรูปแท่ง สร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวก สร้างเอนไซม์คาตาเลส เบื้องต้นจัดเป็นเชื้อ *Bacillus* spp. นำเชื้อมาเลี้ยงใน BHIB ที่อุณหภูมิ 37 °C, 72 ชม. แล้วใส่กลีเซอรินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ความเข้มข้น 20% (v/v) แบ่งใส่หลอด cryotube นำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง -80 °C สำหรับไว้ศึกษาในขั้นต่อไป ก่อนจะนำเชื้อที่เป็นสต็อกไปใช้ทุกครั้งจะนำเชื้อมา subculture 2 ครั้งใน BHIA โดยบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม.

4. ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลาและเชื้อก่อโรคในคนของเชื้อ

Lactobacillus spp. และ *Bacillus* spp. โดยใช้ spot method

นำเชื้อ *Lactobacillus* spp. มาเลี้ยงใน MRSB ในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. และเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. ใน BHIB ที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. นำเชื้อแต่ละชนิดมา 5 มล. หลดลงบน BHIA โดยหยด 3 ตำแหน่งต่อหนึ่งเชื้อ นำงานของ *Lactobacillus* spp. ไปบ่มเพาะในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C, 48 ชม. และบ่มเพาะเชื้อ *Bacillus* spp. ใน BHIA ที่อุณหภูมิ 37 °C, 48 ชม. เพื่อให้เชื้อผลิตสารยับยั้งเชื้อก่อโรคและปล่อยสารออกมารอบ ๆ บริเวณที่เชื้อเจริญอยู่ นำเชื้อโรคของปลาคือ *Aeromonas hydrophila* 3 เชื้อคือ *A. hydrophila*-1, *A. hydrophila*-2, *A. hydrophila*-3 และเชื้อ *Streptococcus agalactiae* 2 เชื้อคือ *S. agalactiae*-1, *S. agalactiae*-2 และเชื้อก่อโรคในคน 7 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* และเชื้อก่อโรคในช่องคลอดได้แก่ *Gardnerella vaginalis* มาเลี้ยงใน BHIB อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. ปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland turbidity standard แล้วผสมเชื้อ 0.1 มล. ต่อ 100 มล. ของ BHIA soft agar (มี agar ผสมอยู่ 0.8%) ที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้วและมีอุณหภูมิ 50 °C ปิดเตาส่วนผสม 4 มล. เททับโคโลนีของ *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* spp. ที่เตรียมไว้ วางให้แข็งตัว นำงานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C, 16-18 ชม. แล้วสังเกตโซนใสหรือ inhibition zone ที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* spp.

5. การจำแนกเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* sp. ด้วยการทำให้ 16S rDNA sequencing

ผลจากการแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* spp. จากดิน ตะกอนตม และทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ และได้ทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของปลาและเชื้อก่อโรคของคน ได้ค้นพบเชื้อ 3 isolate ประด้วย *Lactobacillus* รหัส LS7 และ รหัส LF8 ซึ่งแยกได้จากดิน และจากทางเดินอาหารของปลาตามลำดับ (L = *Lactobacillus*, S = soil, F = Fish หรือสัตว์น้ำ) และเชื้อ *Bacillus* รหัส BS48 (B = *Bacillus*) ที่แยกได้จากดิน ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคของปลา 2 สายพันธุ์และของคน 7 สายพันธุ์ได้ดี จึงได้นำเชื้อนี้มาจำแนกชนิดถึงระดับสปีชีส์โดยการทำ 16S rDNA sequencing แล้วทำการเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์กับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ของเชื้อใน data base เพื่อจำแนกสปีชีส์ การศึกษาในลำดับต่อไปจะศึกษาในรายละเอียดของเชื้อที่แยกได้ทั้ง 3 ตัวนี้ เพื่อคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกสำหรับจะนำมาใช้ในปลาหรือในคนในอนาคต สำหรับการทำให้ 16S rDNA sequencing ได้ส่งไปทำที่ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (National Center for Genetic Engineering and Biotechnology) (BIOTEC) กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

PCR amplification of 16S rDNA

DNA template สำหรับการทำให้ PCR amplification ใช้ "Genomic DNA mini kit (Blood/culture cell)" (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) DNA สำหรับ coding เป็น 16S rRNA จะ amplify ด้วยวิธี PCR โดยใช้ Tag polymerase, ตามวิธีการของ Kawasaki และคณะ (1993), Yamada และคณะ (2000) และ Katsura et al., (2001) ผลผลิตของ PCR สำหรับการหาลำดับเบสของ 16S rDNA จะเตรียมโดยใช้ primer 2 ตัวคือ 20F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCA G-3) ที่ตำแหน่ง 9-27 ของ 16S โดยใช้ *E. coli* numbering system (Brosius et al., 1981) และ 1500R (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3) ตำแหน่งที่ 1509-1542 บน 16S rDNA โดยใช้ the *E. coli* numbering system (Brosius et al., 1981) การทำให้ PCR amplification จะใช้เครื่อง DNA Engine Dyad Thermal Cycle (Bio-Rad Laboratories) ในหลอดของ reaction mixture ประกอบด้วย 15-20 ng template DNA, primer ทั้ง 2 ตัว ตัวละ 2.0 μ moles, 2.5 units Tag polymerase, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP and 10 μ l 10xTag buffer, pH 8.8 ที่มี (NH₄)₂SO₄ ซึ่งประกอบด้วย 750 mM Tris-HCl, 200 mM (NH₄)₂SO₄ และ 0.1% Tween 20 ซึ่งได้โปรแกรมการทำงานของเครื่องคือ ให้มี initial denaturation step ที่ 94 °C, 3 นาที 25 รอบของ denaturation ที่ 94 °C, 1 นาที ทำให้เกิด annealing ที่ 50 °C, 1 นาที และทำให้เกิด elongation ที่ 72 °C, 2 นาที ตามด้วยการ amplification ลำดับสุดท้ายที่ 72 °C, 3 นาที นำผลจากการทำให้ PCR ไปวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose

gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ GenepHlow™ gel/PCR Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) นำผลของ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วเก็บไว้ที่ -20 °C เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

Direct sequencing of 16S rDNA

Direct sequencing ของ single band และ ผลผลิตจาก PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ (ca. 1500 base, บน 16S rDNA ด้วย *E. coli* numbering system; (Brosius et al., 1981) ดังนั้นผลของ PCR ที่บริสุทธิ์จะทำในเครื่อง ABI Prism® 373XL DNA sequence (Applied Biosystem, Foster City, USA) Primer ตัวที่ใช้คือ 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') หรือ 800R (5'-TAC CAG GGT ATC TAA TCC-3) และ 518F (5'-CCA GCA GCC GTA ATA CG-3') หรือ 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3) สำหรับ single strand 16S rDNA sequencing และใช้ primer 4 ตัวได้แก่ 27F, 518F, 800R และ 1492R สำหรับ double strands 16S

Sequencing analysis

The nucleotide sequencing ที่ได้จาก primer ทั้งหมด จะถูก assemble โดยใช้ Cap contig assembly program ซึ่งเป็น accessory ที่ใช้ใน Biedit (Biological sequencing alignment editor) Program (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.htm>) การ identification ของ phylogenetic neighbor จะใช้ BLASTN (Altschul et al., 1997) program เทียบกับ database ของ type strains ที่มี validly published prokaryotic names (Kim et al., 2012) 30 sequence ที่มีคะแนนสูงสุดจะถูกเลือกเพื่อใช้ในการคำนวณเปรียบเทียบความเหมือนโดยใช้ global alignment algorithm (Myer & Miller, 1988) ซึ่งอยู่ใน The EzTaxon-e server (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>; Kim et al., 2012)

หมายเหตุ

ผลจากการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อพบว่า LS7 เป็นเชื้อ *Lactobacillus pentosus*, LF8 เป็นเชื้อ *Lactobacillus plantarum* และ BS48 เป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งจะใช้ชื่อเหล่านี้ในการทดลองต่อไป โดยเชื้อแต่ละตัวจะมีรหัสเดิมต่อท้ายเพื่อให้ทราบที่มา และได้นำเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 ซึ่งเป็นโพรไบโอติกที่สำคัญของคนมาศึกษาเปรียบเทียบกับเชื้อที่แยกได้และจะเรียกชื่อ *L. rhamnosus* GG และเชื้อโรคของปลาที่ใช้ทดสอบในการทดลองต่อไปคือ *A. hydrophila*-1 ซึ่งจะเรียกชื่อ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae*-1 ซึ่งจะเรียกชื่อ *S. agalactiae*

6. การศึกษาสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamnosus* GG

สารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของเชื้อในกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เรียกรวมกันประกอบด้วยกรดต่าง ๆ เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก short chain fatty acids และอื่น ๆ เชื้อบางสายพันธุ์อาจจะผลิต hydrogen peroxide หรือผลิตสารประเภทโปรตีนที่เรียกว่า bacteriocin เชื้อที่มีความสามารถในการสร้างสารเหล่านี้ได้หลายชนิดและมีปริมาณมาก จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดี เนื่องจากสารเหล่านี้จะออกฤทธิ์ร่วมกันในการฆ่าเชื้อ ซึ่งในการศึกษาส่วนนี้จะหาปริมาณกรดแลคติก กรดอะซิติก ความสามารถในการผลิต hydrogen peroxide และ พิสูจน์ว่าสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อส่วนนี้อาจจะเป็นสารโปรตีนหรือ bacteriocin จากเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และเชื้อ *L. rhamnosus* GG

6.1 ความสามารถในการสร้างกรดแลคติก (lactic acid) และกรดอะซิติก (acetic acid)

นำเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *L. rhamnosus* GG มาเลี้ยงในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C, 48 ชม. ส่วนเชื้อ *B. subtilis* BS48 เลี้ยงใน BHIB ที่อุณหภูมิ 37 °C, 48 ชม. นำเชื้อมาปั่นเหวี่ยงด้วยความแรง 3,000 g, 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C กรองด้วยแผ่นกรองรูขนาด 0.22 µm เพื่อให้ปราศจากเชื้อ นำไปทดสอบหาปริมาณกรดแลคติกและกรดอะซิติก โดยใช้ high performance liquid chromatography (HPLC) ใช้คอลลัมน์ (column) C18 (150x4.4 มม., 5 µm) อุณหภูมิของคอลลัมน์ 40 °C ฉีดตัวอย่าง 20 มล. เข้าไปในเครื่อง HPLC และวัดหาปริมาณสารโดยใช้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 220 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ประกอบด้วย 25 mM KH₂PO₄, pH 2.5 :methanol, 97:3 กำจัดก๊าซก่อนใช้และอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 0.3 มล./นาที โดยใช้กรดแลคติกและกรดอะซิติกที่เป็น HPLC เกรด เป็นมาตรฐานในการวัด

6.2 ความสามารถในการผลิต hydrogen peroxide

นำเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamnosus* GG มาทดสอบความสามารถในการผลิต hydrogen peroxide เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRSA ใส่สาร hemin 5 มก./มล., vitamin K, 0.01 มก./มล., horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich, USA) 0.05 มก./มล., 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich, USA) 0.05 มก./มล. ทำการ smear *Lactobacillus* spp. ลงบน MRSA นำเชื้อ *Lactobacillus* spp. ไปบ่มเพาะเชื้อในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C, 48 ชม. นำจานเพาะเชื้อมาให้สัมผัสกับอากาศ แล้วสังเกตโคโลนีของเชื้อว่ามีสีน้ำเงินหรือสีน้ำตาลหรือไม่ ซึ่งแสดงว่าเชื้อมีการสร้าง hydrogen peroxide โดยประเมินจากสีของโคโลนี ถ้ามีสีน้ำเงินแสดงว่าสร้างได้ดี ถ้าเป็นสีน้ำตาลแสดงว่าสร้างได้ปานกลาง ถ้ามีสีน้ำตาลอ่อนแสดงว่า

สร้างได้น้อย ถ้ามีสีขาวแสดงว่าไม่สร้าง hydrogen peroxide สำหรับเชื้อ *B. subtilis* BS48 ทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ BHIA แทนโดยมีส่วนประกอบอื่นและวิธีการทดสอบเหมือนกันและนำจานเพาะเชื้อไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C, 48 ชม. แล้วสังเกตสีของโคโลนีที่เกิดขึ้น

6.3 ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อที่เป็นโปรตีนหรือแบคทีริโอซิน

เลี้ยงเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8 และ *L. rhamnosus* GG ในอาหาร MRSB ในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C, 48 ชม. และเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* BS48 ในอาหาร BHIB บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C, 48 ชม. นำเชื้อที่เลี้ยงได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยความแรง 3,000 g, 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C แยกเอาส่วนใสมากรองด้วยแผ่นกรองรูขนาด 0.22 µm เพื่อทำให้ปราศจากเชื้อแล้วนำไปทำ freeze-dry เพื่อให้เป็นผงแห้ง นำผงแห้งที่ได้มาละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 50 เท่า (50x) ของความเข้มข้นเริ่มต้น นำไปใส่เอนไซม์ย่อยโปรตีนได้แก่ proteinase K และ pepsin ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มก./มล. นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C, 2 ชม. เพื่อให้เอนไซม์ออกฤทธิ์ และดูว่าสารที่ออกฤทธิ์นั้นเป็นสารพวกโปรตีนที่ไวต่อเอนไซม์หรือไม่ และต้องการจะศึกษาว่าสารยับยั้งเชื้อถูกทำลายได้ด้วยความร้อนหรือไม่ โดยนำผงแห้งที่เป็นสารยับยั้งเชื้อมาละลายน้ำให้ได้ 50x ส่วนหนึ่งนำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 °C, 15 นาที อีกส่วนหนึ่งนำไปเข้าหม้อน้ำอัดไอน้ำอุณหภูมิ 121 °C, ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที นำเชื้อก่อโรคในปลา *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* มาเลี้ยงใน BHIB ที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. ปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland turbidity standard เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar (MHA) จานละ 16 มล. วางให้แข็งตัวเพื่อเตรียมเป็น base layer และเตรียม MHA ส่วนที่เป็น seed layer โดยนำ MHA มาทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อน้ำอัดไอน้ำแล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ให้อุณหภูมิเย็นลงที่ 50 °C ใส่เชื้อก่อโรคของปลาลงไป 0.1 มล. ต่ออาหาร 100 มล. เทลงในจานเพาะเชื้อที่เป็น base layer จานละ 4 มล. วางให้แข็งตัวบนพื้นเรียบ โดยใช้ 2 จานต่อเชื้อ 1 ชนิด แล้ววาง cylinder cup ลงไป 3 cup ต่อหนึ่งจานเพาะเชื้อ นำสารละลายที่เตรียมไว้ใส่ลงใน cylinder cup 300 มล./cup นำจานเพาะเชื้อไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C, 16-18 ชม. สังเกตการเกิด inhibition zone รอบ cylinder cup แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบขนาดของ inhibition zone ของสารที่ไม่ผ่านการใส่เอนไซม์และผ่านการให้ความร้อน

7. การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ

เชื้อที่เป็นโปรไบโอติกที่ทนต่อยาปฏิชีวนะซึ่งจะเป็นข้อดีคือ ในการเลี้ยงสัตว์น้ำที่จำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะ จะสามารถใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับเชื้อโปรไบโอติกได้ ซึ่งจะช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะลงอย่างไรก็ตาม การดื้อต่อยาปฏิชีวนะอาจจะเกิดจากยีนที่พลาสมิทของเชื้อและอาจจะถ่ายทอดไปยัง

เชื้อก่อโรคได้ แต่ถ้ายีนดื้อยานั้นอยู่บนโครโมโซมจะมีการถ่ายทอดไปยังเชื้อก่อโรคได้ยาก แต่ถ้าเชื้อไม่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะตัวใดแสดงว่าเชื่อนั้นมีความปลอดภัยจากยีนดื้อยา ในเบื้องต้นจะทำการทดสอบดูว่าเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียและเชื้อบาซิลลัสมีความไวต่อยาปฏิชีวนะมากน้อยเพียงใด ซึ่งทดสอบโดยใช้ disc diffusion method นำเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8 มาเลี้ยงใน MRSB ในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. และนำเชื้อ *B. subtilis* BS48 มาเลี้ยงใน BHIB ที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. ปรับเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland turbidity standard ใช้สำลีพันปลายไม้ป้ายเชื้อ *Lactobacillus* spp. ลงบน MRSA elli elli ให้ทั่วจาน แล้วหมุนจานไปครั้งละ 60 องศา 2 ครั้ง ทุกครั้งที่หมุนจานไปให้ป้ายเชื้อซ้ำให้ทั่วผิวหน้า ส่วน *B. subtilis* BS48 ให้ทำเช่นเดียวกันแต่ป้ายเชื้อลงบน MHA วาง disc ของยาปฏิชีวนะลงบนจานเพาะเชื้อ โดยยาแต่ละชนิดให้ทดสอบ 3 ซ้ำ ยาปฏิชีวนะที่ใช้ได้แก่ Ampicillin (10 µg), Bacitracin (10 IU), Cefoperazone (75 µg), Ceftazidime (30 µg), Cephalotin (30 µg), Kanamycin (30 µg), Norfloxacin (10 µg), Penicillin G (10 IU), Polymyxin B (300 IU) และ Streptomycin (10 µg) นำจานเพาะเชื้อไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C, 16-18 ชม. วัด inhibition zone รอบแผ่น disc แล้วแปลผลค่าความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะตามเกณฑ์ของ the National Committee for Clinical Laboratory Standards (2012)

8. ความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อกับเมือกที่ติดตัวปลาและเมือกจากทางเดินอาหารของปลา

8.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

ความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อที่เป็นโพรไบโอติกเป็นคุณสมบัติอย่างหนึ่งที่สำคัญ ถ้าเชื้อสามารถยึดเกาะกับเมือกที่ติดตัวปลา และเมือกจากทางเดินอาหารของปลาได้ดี จะทำให้เชื่อนั้นมีโอกาสเจริญเติบโตอยู่กับตัวปลาได้นาน สามารถป้องกันเชื้อโรคที่เกิดกับปลาได้ นำ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, และ *L. rhamnosus* GG มาเลี้ยงใน MRSB ในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. และนำเชื้อ *B. subtilis* BS48 มาเลี้ยงใน BHIB ที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. นำเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วยความแรง 3,000 g, 10 นาที ล้างตะกอนของเชื้อที่ได้ด้วย 10 mM phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS) 2 ครั้ง นำเชื้อมากระจายตัวใน PBS วัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD เท่ากับ 0.6-0.7 เพื่อให้เชื้อได้จำนวนเท่ากับคือประมาณ 10^7 - 10^8 cfu/ml. นำเชื้อที่ได้มานับด้วย plate count method เพื่อเปรียบเทียบกับค่า OD ที่วัดได้

สำหรับเชื้อก่อโรคของปลาที่จะใช้ทดสอบนั้น เลี้ยงเชื้อ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ใน BHIB ที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. แล้วเตรียมเชื้อให้มีปริมาณ 10^7 - 10^8 cfu/ml. ตามวิธีการที่กล่าวแล้วข้างต้น

8.2 การเตรียมเมือกที่ติดตัวปลาและเมือกจากทางเดินอาหารของปลา

นำปลานิล (*Oreochromis niloticus*) มาเลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้แน่ใจว่าปลาไม่มีโรค แยกเมือกจากปลาทันทีที่ทำให้ปลาตายโดยใช้วิธีการของ Cohen และ Laux (1995) การนำเมือกที่ติดตัวปลาและทางเดินอาหารของปลา ใช้สเปตตูลายาง (rubber spatula) ขูดเมือกเบา ๆ นำเมือกที่ได้ใส่ลงใน PBS ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความแรง 12,000 g, 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อกำจัดเซลล์ที่ติดมาออกไป แบ่งใส่ cryotube หลอดละ 1 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะนำมาใช้ในการศึกษาต่อไป

8.3 การวัดปริมาณโปรตีนของเมือกจากปลา

นำเมือกที่ได้มาวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีของ Lowry และ คณะ (1951) ซึ่งดัดแปลงโดย Miller และ Hoskins (1981) และใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน เมือกที่ใช้สำหรับการทดสอบต่าง ๆ จะปรับให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.5 มก./มล.

8.4 การทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับเมือกที่ติดตัวปลาและเมือกจากทางเดินอาหารของปลา

ทำการทดสอบความสามารถในการยึดเกาะกับเมือกที่ติดตัวปลาและเมือกจากทางเดินอาหารของปลาโดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Balcázar และคณะ (2007) นำเมือกปลามาให้ยึดติด (immobilize) ใน 96-well microtiter plate โดยใส่เมือกความเข้มข้น 0.5 มก./มล. ลงไปหลุมละ 100 มคล. โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C, 1 คืน ดูส่วนของเมือกที่ไม่ยึดติดกับหลุมออก แล้วล้าง 2 ครั้งด้วย PBS 250 มคล. นำเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, และ *L. rhamnosus* GG และ *B. subtilis* BS48 ที่เตรียมไว้ในข้อ 8.1 ใส่ลงไป 100 มคล.ต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C, 1 ชม. เชื้อที่ไม่ยึดเกาะจะถูกล้างออกด้วย PBS 250 มคล. 2 ครั้ง แล้วเติม 0.05% triton X-100 ลงไป 250 มคล. บ่มไว้ 10 นาที เพื่อย่อยเมือกและทำให้แบคทีเรียที่ยึดเกาะหลุดออกมา นำเชื้อมาเจือจางแบบ 10-fold serial dilution และนำไปนับจำนวนเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่บ่มเพาะที่เหมาะสมกับ *Lactobacillus* spp. และ *B. subtilis* BS48 ดังที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น การทดลองแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ เปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่ยึดเกาะจะคำนวณเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อที่ใส่ลงไปให้หลุม

8.5 ความสามารถในการแทรกตัวเข้าไปในเมือกปลา

นำเมือกปลาที่มีปริมาณโปรตีน อย่างละ 0.5 มก./มล. 100 มคล. ใส่ลงใน 96-well microtiter plate บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C, 1 คืน เทส่วนของเมือกที่ไม่ยึดติดกับหลุมออก แล้วล้าง 2 ครั้งด้วย PBS 250 มคล. นำเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamnosus*

GG ที่เตรียมไว้ในข้อ 8.1 มาทดสอบการแทรกตัวเข้าไปในเมือก ตามวิธีการของ Cohen และ Laux, (1995) โดยใส่เชื้อลงใน microtiter plate หลุมละ 100 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชม. โดยเชื้อ 1 ตัวจะใช้ 3 หลุมกับทุกเวลาที่ใช้บ่ม จากนั้นดูส่วนที่เป็นของเหลวออกจากหลุม เชื้อที่ไม่ยึดเกาะจะถูกล้างออกด้วย PBS 250 มล. 2 ครั้ง แล้วเติม 0.05% triton X-100 ลงไป 250 มล. บ่มไว้ 10 นาที เพื่อย่อยเมือกและทำให้แบคทีเรียที่แทรกตัวเข้าไปในเมือกหลุดออกมา นำเชื้อมาเจือจางแบบ 10-fold serial dilution และนำไปนับจำนวนเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่บ่มเพาะที่เหมาะสมกับ *Lactobacillus* spp. และ *B. subtilis* BS48 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่ยึดเกาะจะคำนวณเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อที่แทรกเข้าไปในเมือกกับปริมาณของเชื้อเริ่มต้นที่ใส่ลงไป

8.6 การทดสอบว่าเชื้อยึดเกาะกับเมือกของปลาแบบจำเพาะเจาะจงหรือไม่

ทำการเปรียบเทียบการยึดเกาะของเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS4 และ *L. rhamnosus* GG ต่อเมือกของปลา bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, USA) และกับพื้นผิว microtiter plate well ซึ่งเป็นพลาสติก polystyrene นำ BSA ที่มีปริมาณโปรตีน 0.5 มก./มล. และเมือกปลาที่มีปริมาณโปรตีน 0.5 มก./มล. 100 มล. ใส่ลงใน 96-well microtiter plate บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C, 1 คืน เทส่วนของเมือกที่ไม่ยึดติดกับหลุมออก แล้วล้าง 2 ครั้งด้วย PBS 250 มล. ทำการทดสอบการยึดเกาะของเชื้อเหมือนวิธีการที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 7.4

8.7 การทดสอบความสามารถในการแย่งการยึดเกาะกับเมือกของปลาระหว่างเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *B. subtilis* BS48 กับเชื้อก่อโรคของปลาด้วยกลไก competitive exclusion

นำเมือกจากทางเดินอาหารของปลาที่มีปริมาณโปรตีน 0.5 มก./มล. 100 มล. ใส่ลงใน 96-well microtiter plate บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C, 1 คืน ดูส่วนของเมือกที่ไม่ยึดติดกับหลุมออก แล้วล้าง 2 ครั้งด้วย PBS 250 มล. การทดสอบการเกิด competitive exclusion ใส่เชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus subtilis* BS48 ที่เตรียมไว้ในหัวข้อ 8.1 100 มล. ลงในหลุมที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C, 1 ชม. (และให้เว้นหลุมที่ไม่ใส่เชื้อเอาไว้ส่วนหนึ่ง) ล้างเชื้อที่ไม่เกาะออก 2 ครั้งด้วย PBS pH 7.4 ก่อนจะใส่เชื้อก่อโรค *A. hydrophila* หรือ *S. agalactiae* 100 มล. ลงไปทุกหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C, 1 ชม. ล้างเชื้อที่ไม่เกาะออก 2 ครั้งด้วย PBS pH 7.4 แล้วเติม 0.05% triton X-100 ลงไป 250 มล. บ่มไว้ 10 นาที เพื่อย่อยเมือกและทำให้เชื้อก่อโรคที่เกาะเมือกหลุดออกมา นำเชื้อมาเจือจางแบบ 10-fold serial dilution และนำไปนับจำนวนเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่บ่มเพาะที่เหมาะสมกับ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* การทดลองแต่ละครั้งทำ 3 ซ้ำ

เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของเชื้อก่อโรคที่ยึดเกาะบนเมือกปลาขณะที่มีเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *B. subtilis* BS48 กับที่ไม่มีเชื้อเหล่านี้เกาะอยู่บนเมือกปลามาก่อน

9. ความสามารถในการเกาะกลุ่มกับเชื้อก่อโรคและการทดสอบความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์

9.1 ความสามารถในการเกาะกลุ่มกับเชื้อก่อโรค

การศึกษาการเกาะกลุ่มของเชื้อโพรไบโอติกกับเชื้อก่อโรคจะทำตามวิธีของ Handley และ คณะ (1987) โดยนำเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamnosus* GG และเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agactiae* ที่เลี้ยงไว้ มาปรับความขุ่นของเชื้อแต่ละชนิดให้ได้ค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.6-0.7 นำเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamnosus* GG มา 0.5 มล. ผสมกับเชื้อก่อโรค 0.5 มล. บั่นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 °C, 4 ชม. แล้ววัดค่า OD ของเชื้อ ส่วนเชื้อที่เป็น control ใช้เชื้อแต่ละชนิดเดี่ยว ๆ เชื้อละ 1 มล. แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์ของการเกาะกลุ่มของเชื้อโดยใช้สมการของ Handley และ คณะ (1987) เปอร์เซ็นต์การเกาะกลุ่ม = $[(SC + LC)/2] (S + L) / (SC + LC) \times 100$ ซึ่ง SC และ LC คือค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของเชื้อที่เป็น control ของเชื้อก่อโรคและเชื้อโพรไบโอติกที่ทดสอบตามลำดับ หลังจากบ่มไว้ 4 ชม. (S + L) คือค่า OD ของเชื้อที่ผสมกันหลังจากบ่มไว้ 4 ชม.

9.2 การทดสอบความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์

ผิวเซลล์แบคทีเรียที่มีความไม่ชอบน้ำ (surface hydrophobicity) สูงจะมีโอกาสรวมกลุ่มกันเอง (autoaggregation) ได้ดี การไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์แสดงด้วยค่า SAT (SAT value) ตามวิธีของ Pascual และ คณะ (2008) โดยนำเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, และ *L. rhamnosus* GG และ *B. subtilis* BS48 ที่เลี้ยงไว้ 24 ชม. มาปรับปริมาณของเชื้อด้วย 0.02 โมล/ลิตร sodium phosphate pH 6.8 ให้ได้ปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^9 cfu/มล. และนำมาผสมกับสารละลาย ammonium sulfate ที่ความเข้มข้น 4.0, 2.0, 1.5 และ 0.5 โมล/ลิตร บนสไลด์แก้วโดยใช้เชื้อและ ammonium sulfate ปริมาณเท่า ๆ กัน แล้วมองด้วยกล้องจุลทรรศน์ ความเข้มข้นของ ammonium sulfate ที่ทำให้แบคทีเรียรวมกลุ่มกันเองกำหนดให้เป็นค่า SAT ถ้าค่า SAT < 0.5 โมล/ลิตร, 0.5-1.5 โมล/ลิตร และ > 1.5 โมล/ลิตร แสดงว่าผิวของเซลล์มีความไม่ชอบน้ำ สูง ปานกลาง และ ต่ำ ตามลำดับ

10. ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม

ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ของ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamnosus* GG จะทำการวิเคราะห์โดยใช้สี crystal violet ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Morohoshi และ คณะ (2008) นำเชื้อ 10^8 cfu/มล. มาเจือจาง 100 เท่าด้วย soybean-casein digest broth (SCDB) นำเชื้อที่ได้มา 200 มล. ใส่ลงใน 96-well microtiter plate 3 หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 15 °C, 24 ชม. แล้วนำสารละลายสี 1% crystal violet ใส่ลงในหลุม หลุมละ 25 มล. วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ต่อมาใส่ 95% ethanol ลงไป 200 มล. เพื่อละลายสี crystal violet นำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader และวัดค่า OD ของหลุมที่เป็น control ซึ่งใช้ SCDB อย่างเดียว นำค่า OD ที่ได้ไปลบออกจากค่า OD ที่ได้จากหลุมที่ใส่เชื้อ เชื้อที่ให้ค่า OD สูงแสดงว่าสามารถสร้างไบโอฟิล์มได้ดี

11. ความสามารถในการทนต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรงในทางเดินอาหารของปลา

11.1 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ

นำ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, และ *L. rhamnosus* GG มาเลี้ยงใน MRSB ในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. และนำเชื้อ *B. subtilis* BS48 มาเลี้ยงใน BHIB ที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. นำเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วยความแรง 3,000 g, 10 นาที ล้างตะกอนของเชื้อที่ได้ด้วย 10 mM phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS) 2 ครั้ง นำเชื้อมากระจายตัวใน PBS วัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD เท่ากับ 0.6-0.7 เพื่อให้ได้เชื้อจำนวนเท่ากันคือประมาณ 10^7 - 10^8 cfu/มล. โดยเจือจางเชื้อด้วย PBS แล้วนับจำนวนเชื้อด้วย plate count method โดยใช้ MRSA สำหรับ *Lactobacillus* spp. และ BHIA สำหรับ *B. subtilis* BS48 เพื่อเปรียบเทียบกับค่า OD ที่วัดได้

11.2 ความสามารถในการทนต่อ pH ในทางเดินอาหารจำลองของปลา

นำ PBS มาปรับ pH ด้วย HCl ให้ได้ pH 2.0, 3.0, 5.0 และ 6.0 (Prasad et al., 1998) นำ PBS ที่ปรับ pH แล้วมา 4.5 มล. และใส่เชื้อที่เตรียมไว้ จากข้อ 11.1 ลงไป 0.5 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C นับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตที่เวลา 0, 1, 2, และ 3 ชม. ตามวิธีในหัวข้อ 11.1

11.3 ความสามารถในการทนต่อน้ำดีของปลา

วิธีการทดสอบน้ำดีของปลาดัดแปลงมาจากวิธีของ Nikoskelainen และคณะ (2001) เก็บน้ำดีจากถุงน้ำดีของปลานิล นำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำมาใช้ ก่อนใช้น้ำดีมาเจือจาง

ด้วย PBS ให้มีความเข้มข้น 10% แล้วนำมา 4.5 มล. ใส่เชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 11.1 ลงไป 0.5 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C, 1.5 ชม. นับจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอด ตามวิธีในหัวข้อ 11.1

12. การเตรียมเพลเลตต้นแบบจากเชื้อ *Bacillus subtilis* BS48

เนื่องจากเชื้อ *B. subtilis* BS48 เป็นเชื้อที่สร้างสปอร์ สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่รุนแรงของกระบวนการเตรียมเพลเลตได้ดีกว่าเชื้อ *Lactobacillus* spp. จึงใช้เชื้อนี้มาเตรียมเป็นเพลเลตลอยน้ำต้นแบบเพื่อทำเป็นอาหารปลา ซึ่งเป็นวิธีการนำส่งเชื้อโพรไบโอติกไปให้ปลาหรือสัตว์เลี้ยงได้ในอนาคต

12.1 การเตรียมสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* BS48

เลี้ยง *B. subtilis* BS48 บน BHIA slant ที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. ใช้น้ำเกลือปราศจากเชื้อ 3 มล. และเม็ดแก้ว (glass bead) ปราศจากเชื้อ 3-4 เม็ด ใส่ลงไปในห้องของเชื้อเขย่าเบา ๆ เพื่อให้เม็ดแก้วขูดเชื้อออกมาจากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นดูดเชื้อทั้งหมดใส่ลงในขวด Roux ที่บรรจุ Difco sporulation medium (DSM) ไว้ 250 มล. และใส่เม็ดแก้วลงไป 4-5 เม็ด ตะแกงขวดไปมาให้เม็ดแก้วกลิ้งเพื่อกระจายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C, 5 วัน ใส่น้ำเกลือลงไปในขวด 35 มล. กลิ้งเม็ดแก้วไปมาเพื่อนำเชื้อออกจากผิวหน้าของอาหาร นำเชื้อมาทำ heat shock ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 80 °C, 10 นาที เพื่อทำลายตัวเชื้อให้เหลือแต่สปอร์ นำสปอร์ไปตรวจนับจำนวนโดยการทำ 10-fold serial dilution แล้วนับเชื้อโดยวิธี spread plate ด้วย BHIA เก็บสปอร์ของเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C สำหรับการเตรียมเป็นเพลเลต

12.2 การเตรียมสูตรเพลเลต

วัตถุดิบที่ใช้เพื่อการเตรียมเพลเลตประกอบด้วยอาหารและส่วนประกอบอื่น ๆ ได้แก่ ปลาป่น, แป้งสาลี, รำละเอียด, น้ำมันพืช, ฟอสฟอรัส (แร่ธาตุรวม), microcrystalline celluloses (Avicel PH101™) เป็นสารช่วยในการยัดเกาะ, น้ำตาล, ยีสต์ และสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* BS48 นำสปอร์ที่ได้ไปเตรียมเป็นเพลเลตกับวัตถุดิบ 3 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ซึ่งต้องการให้เพลเลตที่ได้มีเชื้อรอดชีวิตอยู่ในเพลเลตได้สูง และสามารถลอยน้ำได้นาน และมีความกร่อนต่ำ

ตารางที่ 2.1 สูตรในการเตรียมเพลเลตลอยน้ำของเชื้อ *Bacillus subtilis* BS48

ส่วนประกอบในตำรับ	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
ปลาป่น	52.5 กรัม	52.5 กรัม	52.5 กรัม
แป้งสาลี	30 กรัม	30 กรัม	30 กรัม
รำละเอียด	30 กรัม	30 กรัม	30 กรัม
น้ำมันพืช	6 กรัม	25 กรัม	6 กรัม
พรีมิกซ์ (แร่ธาตุรวม)	0.15 กรัม	0.15 กรัม	0.15 กรัม
Avicel PH101™	10.5 กรัม	10.5 กรัม	10.5 กรัม
น้ำตาล	7 กรัม	-	-
ยีสต์	7 กรัม	-	-
<i>B. subtilis</i> BS48 spore suspension	40 มล. 8.26x10 ⁸ cfu	25 มล. 8.57x10 ⁸ cfu	43 มล. 8.62x10 ⁸ cfu

หมายเหตุ: จำนวนเชื้อแบคทีเรียในแต่ละตำรับควรมีไม่น้อยกว่า 10⁷ cfu/กรัม

วิธีเตรียมเพลเลตด้วยวิธี extrusion – spheronization

ผสม Avicel PH101™, ปลาป่น, แป้งสาลี, รำละเอียด, น้ำตาล, ยีสต์, พรีมิกซ์ และ น้ำมันพืช เข้าด้วยกัน ใช้เวลา 3 นาที ในเครื่องผสมปั่นผสม เติมน้ำ bacterial spore suspension ลงไป นวดผสม ให้เข้ากันจนได้เป็น damp mass นำ damp mass มาเข้าเครื่อง extruder ซึ่งมีรูขนาด 2 มม. จะได้ extrudate นำ extrudate มาทำให้กลมด้วยเครื่อง spheronizer ด้วยความเร็วรอบ 800 rpm เป็นเวลา 5 นาที จะได้เพลเลต แล้วนำเพลเลตมาทำให้แห้งด้วยตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 6 ชม. ยกเว้นสูตรตำรับที่ 1 ใส่ น้ำตาลและยีสต์เพิ่มเติมจากส่วนประกอบหลัก เพื่อให้ยีสต์หมักน้ำตาลกลายเป็น CO₂ เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิต ทำให้เกิดรูพรุนภายในเพลเลต ภายหลังการอบแห้ง โดยใช้ผ้าปิดภาชนะที่บรรจุเพลเลตไว้หมักเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนนำเพลเลตไปอบแห้ง กระบวนการผลิตเพลเลตแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 กระบวนการเตรียมเพลเล็ตด้วยวิธี extrusion – spheronization

12.3 ศักยภาพสมบัติทางกายภาพของเพลเล็ต

12.3.1 การประเมินขนาด (size)

สุ่มตัวอย่างเพลเล็ตแต่ละตำรับ (n=100) วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยใช้เครื่อง antibiotic zone reader แล้วหาค่าเฉลี่ย

12.3.2 การประเมินความกร่อน (friability)

นำเพลเล็ต 5 กรัม ผสมกับ glass bead (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มม.) ใช้เครื่อง friabilator หมุนด้วยความเร็ว 25 rpm เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นคำนวณ % ความกร่อน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ในแต่ละตำรับ แล้วหาค่าเฉลี่ย (ควรมี % ความกร่อนน้อยกว่า 1 %)

$$\% \text{ ความกร่อน} = \frac{\text{น้ำหนักของเพลเล็ตที่หายไป}}{\text{น้ำหนักของเพลเล็ตเริ่มต้น}} \times 100$$

12.3.3 การประเมินความสามารถในการลอยน้ำ (floating ability)

สุ่มตัวอย่างเพลเลตของแต่ละสูตรตำรับ (n=100) กระจายในบีกเกอร์ขนาด 250 มล. ซึ่งมีน้ำกลั่น 100 มล. ที่อุณหภูมิห้อง นับจำนวนเพลเลตที่ลอยอยู่บนผิวน้ำกลั่น บันทึกจำนวนเพลเลตที่ลอยอยู่บนผิวน้ำกลั่น เมื่อเวลาผ่านไป 0, 5, 10, 20 และ 30 นาที ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละตำรับ

$$\% \text{ ความสามารถในการลอยน้ำ} = \frac{\text{จำนวนเพลเลตที่ลอยน้ำ}}{\text{จำนวนของเพลเลตเริ่มต้น}} \times 100$$

12.3.4 การศึกษาลักษณะของเพลเลตโดยใช้ เครื่อง scanning electron microscope

ศึกษาลักษณะของเพลเลตที่เตรียมขึ้น โดยใช้เครื่อง scanning electron microscope (SEM) (JSM-5800LV, JEOL, Japan) เตรียมตัวอย่างโดยนำเพลเลตมาวางบนแท่นวางตัวอย่างแล้วทำการเคลือบด้วยทอง จากนั้นนำตัวอย่างที่เคลือบทองแล้วมาส่งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เพื่อดูลักษณะพื้นผิว และลักษณะสปอร์ของเชื้อแบคทีเรียในเพลเลต

12.3.5 การหาจำนวนเชื้อแบคทีเรีย (viable bacteria) ในเพลเลต

นำ เพลเลต 0.5 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 4.5 มล. เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เจือจางเชื้อที่ปลดปล่อยออกมาแบบ 10-fold serial dilution ในน้ำเกลือ (0.85% NaCl) หาจำนวนเชื้อด้วยวิธี spread plate โดยใช้ BHIA จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละตำรับ นับจำนวนเชื้อแล้วหาค่าเฉลี่ย

12.3.6 วิธีการหาจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตในเพลเลตเมื่ออยู่ในสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง (simulated gastric condition)

เตรียม simulated gastric solution โดยใช้ normal saline pH 2 (ปรับ pH โดยใช้ 1M HCl) นำเพลเลต 0.5 กรัม ใส่ลงใน normal saline pH 1.5 ปริมาตร 4.5 มล. บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง หาจำนวนเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 1 และ 2 ชม. ทำการเจือจางเชื้อที่ปลดปล่อยออกมาแบบ 10-fold serial dilution ในน้ำเกลือ หาจำนวนเชื้อด้วยวิธี spread plate โดยใช้ BHIA เพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งในแต่ละตำรับ แล้วหาค่าเฉลี่ย

การศึกษาศักยภาพของเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8 และ *B. subtilis* BS48 เป็นโพรไบโอติกในทางเดินอาหารและช่องคลอดของคน

การศึกษาในขั้นตอนนี้จะศึกษาศักยภาพของเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8 และ *B. subtilis* BS48 เปรียบเทียบกับเชื้อโพรไบโอติกสำหรับใช้ในคนคือ *L. rhamnosus* GG

13. ความสามารถของเชื้อในการมีชีวิตรอดในสภาวะจำลองของทางเดินอาหารและช่องคลอดของคน

13.1 การเตรียมเชื้อสำหรับการทดสอบ

นำ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, และ *L. rhamnosus* GG มาเลี้ยงใน MRSB ในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. และเลี้ยง *B. subtilis* BS48 ใน BHIB ที่อุณหภูมิ 37 °C, เมื่อเลี้ยงเชื้อทั้งหมดครบ 24 ชม. แล้ว นำเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วยความแรง 3,000 g, 10 นาที ล้างตะกอนของเชื้อที่ได้ด้วย PBS pH7.4, 2 ครั้ง นำเชื้อที่ได้ไปใช้ทดสอบความสามารถในการทนต่อน้ำดี น้ำย่อยในกระเพาะอาหารจำลอง (simulated gastric fluid) น้ำย่อยในลำไส้เล็กจำลอง (simulated intestinal fluid) และน้ำในช่องคลอดจำลอง (simulated vaginal fluid)

13.2 ความสามารถทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหารจำลอง

เตรียมน้ำย่อยในกระเพาะอาหารจำลอง โดยนำ PBS มาปรับ pH ให้ได้ pH 2, 3 และ 4 ด้วย 1 N HCl แล้วเติมเอนไซม์เปปซิน (pepsin, Sigma-Aldrich, USA) ให้ได้ความเข้มข้น 3 กรัม/ลิตร ใส่เชื้อลงไปให้มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 10^8 cfu/มล. นำ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, และ *L. rhamnosus* GG ไปบ่มเพาะในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C ส่วน *B. subtilis* BS48 นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิที่ 37 °C นับจำนวนเชื้อที่เวลา 0, 1, 2 และ 3 ชม. คำนวณเปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่รอดชีวิต

13.3 ความสามารถในการทนต่อน้ำดี

เตรียมน้ำดีโดยการนำ PBS pH 7.4 มาเติมน้ำดี (oxgall, Sigma-Aldrich, USA) ให้ได้ความเข้มข้น 0.3 % (w/v) ใส่เชื้อลงไปให้มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 10^8 cfu/มล. นำ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, และ *L. rhamnosus* GG ไปบ่มในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C ส่วน *B. subtilis* BS48 นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C นับจำนวนเชื้อที่เวลา 0, 1, 2, และ 3 ชม. คำนวณเปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่รอดชีวิต

13.4 ความสามารถในการทนต่อน้ำย่อยในลำไส้เล็กจำลอง

เตรียมน้ำย่อยในลำไส้เล็กจำลองโดยนำ PBS มาปรับ pH ด้วย 1N NaOH ให้ได้ pH 6.8 แล้วเติมเอนไซม์แพนครีเอติน (pancreatin, Sigma-Aldrich, USA) ให้ได้ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร ใส่เชื้อลงไปให้มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 10^8 cfu/มล. นำ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, และ *L. rhamnosus* GG ไปบ่มเพาะในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C ส่วน *B. subtilis* BS48 นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C นับจำนวนเชื้อที่เวลา 0, 1, 2, 3, และ 4 ชม. คำนวณเปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่รอดชีวิต

13.5 ความสามารถในการทนน้ำในช่องคลอดจำลอง

เตรียมน้ำในช่องคลอดจำลองโดยละลาย sodium acetate (Ajax Finechem Pty Ltd, Australia) 68.04 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มล. และปรับ pH โดยใช้ glacial acetic acid ให้ได้ pH 4.4 แล้วใส่เชื้อที่เตรียมไว้ลงไปให้มีปริมาณเชื้อเท่ากับ 10^8 cfu/มล. นำ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, และ *L. rhamnosus* GG ไปบ่มเพาะในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C ส่วน *B. subtilis* BS48 นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C นับจำนวนเชื้อที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชม. คำนวณเปอร์เซ็นต์ของเชื้อที่รอดชีวิต

จากการทดลองที่ 13.2-13.5 นับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตที่เวลาต่าง ๆ แล้ว จึงนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตจากสมการ

$$\begin{aligned} \text{เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต} &= (N_1/N_0) \times 100 \\ N_1 &= \text{จำนวนเชื้อที่รอดชีวิตที่เวลาต่าง ๆ} \\ N_0 &= \text{จำนวนเชื้อเริ่มต้นก่อนการทดสอบ} \end{aligned}$$

13.6 ความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ผนังลำไส้และเซลล์ช่องคลอดของคน

เชื้อที่สามารถยึดเกาะกับผนังลำไส้หรือช่องคลอดได้ดีสามารถจะมีชีวิตรอดและเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารและช่องคลอดได้ การศึกษาการยึดเกาะของเชื้อที่ผนังลำไส้ของคนจะใช้เซลล์เพาะเลี้ยง คือ Caco-2 ซึ่งเป็นเซลล์ adenocarcinoma ของลำไส้ใหญ่ แต่แสดงคุณสมบัติเหมือนกับเซลล์ที่ผนังลำไส้เล็กคือเมื่อเลี้ยงให้เซลล์เจริญเติบโตและเกิดการ differentiate แล้วจะสร้างไมโครวิลไล (microvilli) และเอนไซม์ของเซลล์ผนังลำไส้เล็กได้ ส่วนเซลล์ผนังช่องคลอดของคนที่ใช้คือ HeLa cell เป็น cell line ที่เป็นตัวแทนของเซลล์ในช่องคลอด ซึ่งเซลล์ทั้ง 2 ชนิดนิยมใช้ในการศึกษาทางเภสัชกรรมและทางการแพทย์มาก

13.6.1 การเพาะเลี้ยง Caco-2 cell

Caco-2 cell (ATCC HTB-37TM) เป็น adenocarcinoma ของคนซึ่งซื้อมาจาก American Type Culture Collection (ATCC) (P.O.Box 1549, Manassas, VA 20108-1549, 703-365-2007 FAX: 703, email: sale@atcc.org) อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ minimum essential medium (MEM) (Gibco, USA) ที่ประกอบด้วย L-glutamine, 17% (v/v) fetal bovine serum (Gibco, USA), 100 µg/ml streptomycin sulfate ผสมกับ 100 IU/ml penicillin G (Gibco, USA) เก็บเซลล์ไว้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี 5% (v/v) dimethylsulfoxide (DMSO) เป็น cryoprotectant แช่ในไนโตรเจนเหลวเมื่อต้องการนำเซลล์มาใช้ต้องนำมาอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C ประมาณ 3-5 วินาที จนอาหารเลี้ยงเซลล์เริ่มละลาย แล้วนำส่วนที่ละลายมาประมาณ 0.5 มล. ไปใส่ลงในอาหารที่เตรียมมาใหม่ 10 มล. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความแรง 1,000 g ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที แยกส่วนใสทิ้งไป นำส่วนตะกอนที่เป็นเซลล์ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์หลอดใหม่ประมาณ 5 มล. แล้วนำไปใส่ tissue culture flask ขนาด 25 มล. บ่มเพาะในตู้บ่มเพาะที่มีบรรยากาศประกอบด้วยอากาศ 95% และ CO₂ 5% ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเซลล์ทุกวันด้วยกล้อง inverted microscope และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 ในช่วง 6 วันแรก และเปลี่ยนทุกวันหลังจากนั้น

13.6.2 การทำ passage Caco-2 cell

เมื่อเซลล์เจริญเติบโตครอบคลุมพื้นที่ culture flask ประมาณ 80% (80% confluence) ดูดอาหารอาหารเลี้ยงเซลล์ออกไป แล้วใส่ 0.1 M phosphate buffer pH 7.4, 5 มล. เพื่อล้างเซลล์ ทำการล้างเซลล์ 3 รอบ ก่อนจะใส่ trypsin EDTA (1:25) 3 มล. ให้ท่วมเซลล์ แล้วบ่มที่ 37 °C ในบรรยากาศที่ประกอบด้วยอากาศ 95% และ CO₂ 5% 1 นาที เซลล์จะถูกย่อยให้แยกออกจากกันแล้วหลุดลอกออกมาจากผิวพลาสติกของ flask ให้กระแทก flask กับสันมือเบา ๆ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผิวพลาสติกโดยสมบูรณ์ ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 7 มล. แล้วถ่ายเซลล์ลงในหลอดพลาสติก ขนาด 15 มล. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความแรง 1,000 g ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เมื่อถึงส่วนใสออกไป ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 2-3 มล. แล้วนับจำนวนเซลล์ โดยนำเซลล์มา 100 มคล. ผสมกับ trypan blue 100 มคล. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปใส่ใน haemocytometer เพื่อนับจำนวนเซลล์ภายใต้ inverted microscope เซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสี ส่วนเซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงิน เมื่อทราบความเข้มข้นของเซลล์แล้ว เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนจะนำไปใส่ใน culture flask ใหม่เพื่อเพาะเลี้ยงต่อไป หรือนำไปใช้ในการทดลอง

13.6.3 การเก็บรักษา Caco-2 cell

ผสม DMSO 1 มล. กับอาหารเลี้ยงเซลล์ 9 มล. เก็บไว้ในตู้เย็น นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้ 80% confluence มาล้างด้วย PBS 10 มล. 3 รอบแล้วใส่ trypsin EDTA 3 มล. บ่มเพาะในตู้บ่มเพาะที่มีบรรยากาศประกอบด้วยอากาศ 95% และ CO₂ 5% อุณหภูมิ 37 °C, 1 นาที เซลล์จะถูกย่อยให้แยกออกจากกันแล้วหลุดลอกออกมาจากผิวพลาสติกของ flask ให้กระแทก flask กับสันมือเบา ๆ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผิวพลาสติกโดยสมบูรณ์ ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 7 มล. แล้วถ่ายเซลล์ลงในหลอดพลาสติก ขนาด 15 มล. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความแรง 1,000 g ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เมื่อทิ้งส่วนใสออกไป ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 5.5 มล. แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DMSO ที่เข้มข้นไว้ที่ละลายพร้อมกับเขย่าภาชนะเบา ๆ จะได้ส่วนผสมของเซลล์กับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DMSO 5% (v/v) แล้วแบ่งเซลล์ใส่ใน cryotube หลอดละ 1 มล. แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้ -80 °C 1 คืน ก่อนจะนำไปแช่ใน ไนโตรเจนเหลว

13.6.4 การเพาะเลี้ยง HeLa cell

HeLa cell (ATCC CCL-2.2™) เป็นเซลล์ cervical carcinoma ของคน ซึ่งซื้อมาจาก American Type Culture Collection อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้คือ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, USA) ซึ่งมี L-glutamine, 10%v/v fetal bovine serum (Gibco, USA), 100 IU/มล. penicillin G ผสมกับ streptomycin sulfate (Gibco, USA) การเก็บรักษาเซลล์จะเก็บในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใส่ 10% dimethylsulfoxide (DMSO) เป็น cryoprotectant เก็บในไนโตรเจนเหลว เมื่อต้องการนำเซลล์มาใช้ต้องนำมาอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C ประมาณ 3-5 วินาที จนอาหารเลี้ยงเซลล์เริ่มละลาย แล้วนำส่วนที่ละลายมาประมาณ 0.5 มล. ไปใส่ลงในอาหารที่เตรียมมาใหม่ 10 มล. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความแรง 1,000 g ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที แยกส่วนใสทิ้งไป นำส่วนตะกอนที่เป็นเซลล์ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์หลอดใหม่ประมาณ 5 มล. แล้วนำไปใส่ลงใน tissue culture flask ขนาด 25 มล. บ่มเพาะในตู้บ่มเพาะที่มีบรรยากาศประกอบด้วยอากาศ 95% และ CO₂ 5% อุณหภูมิ 37 °C ตรวจเช็คการเจริญเติบโตของเซลล์ทุกวันด้วยกล้อง inverted microscope และเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน ในช่วง 6 วันแรก และเปลี่ยนทุกวันหลังจากนั้น

13.6.5 การทำ passage HeLa cell

เมื่อเซลล์เจริญเติบโตครอบคลุมพื้นที่ culture flask ประมาณ 80% (80% confluence) กำจัดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกไป แล้วใส่ 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 5 มล. เพื่อล้างเซลล์ ทำการล้างเซลล์ 3 รอบ ก่อนจะใส่ trypsin EDTA (1:25) 3 มล. ให้ท่วมเซลล์ แล้วบ่มที่ 37 °C ในบรรยากาศซึ่งประกอบด้วย อากาศ 95% และ CO₂ 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C, 1 นาที เซลล์จะถูกย่อยให้แยกออกจาก

กันแล้วหลุดลอกออกมาจากผิวพลาสติกของ flask ให้กระแทก flask กับสันมือเบา ๆ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผิวพลาสติกโดยสมบูรณ์ ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 7 มล. แล้วถ่ายเซลล์ลงในหลอดพลาสติก ขนาด 15 มล. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความแรง 1,000 g ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เมื่อถึงส่วนใสออกไป ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 2-3 มล. แล้วนับเซลล์ โดยนำเซลล์มา 100 มคล. ผสมกับ trypan blue แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปใส่ใน haemocytometer เพื่อนับจำนวนเซลล์ภายใต้ inverted microscope เซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสี ส่วนเซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงิน เมื่อทราบความเข้มข้นของเซลล์แล้ว ให้เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ก่อนจะนำไปใส่ใน culture flask ใหม่เพื่อเพาะเลี้ยงต่อไป หรือนำไปใช้ในการทดลอง

13.6.6 การเก็บรักษา HeLa cell

ผสม DMSO 1 มล. กับอาหารเลี้ยงเซลล์ 9 มล. แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้ 80% confluence มาล้างด้วย PBS 10 มล. 3 รอบแล้วใส่ trypsin EDTA 3 มล. นำไปบ่มในบรรยากาศซึ่งประกอบด้วย อากาศ 95% และ CO₂ 5% อุณหภูมิ 37 °C, 1 นาที เซลล์จะถูกย่อยให้แยกออกจากกันแล้วหลุดลอกออกมาจากผิวพลาสติกของ flask ให้กระแทก flask กับสันมือเบา ๆ เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากผิวพลาสติกโดยสมบูรณ์ ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 7 มล. แล้วถ่ายเซลล์ลงในหลอดพลาสติก ขนาด 15 มล. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความแรง 1,000 g ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เมื่อถึงส่วนใสออกไป ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 5.5 มล. แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DMSO ที่แช่เย็นไว้ที่ละลายพร้อมๆกับเขย่าภาชนะเบา ๆ จะได้ส่วนผสมของเซลล์กับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี DMSO 5% (v/v) แล้วแบ่งเซลล์ใส่ใน cryotube หลอดละ 1 มล. นำไปเก็บไว้ในตู้ -80 °C 1 คืน ก่อนจะนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว

13.6.7 การเตรียมเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* sp. เพื่อทดสอบการยึดเกาะกับเซลล์

นำ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, และ *L. rhamnosus* GG มาเลี้ยงใน MRSB ในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. และเลี้ยง *B. subtilis* BS48 ที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. BHIB นำเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C ด้วยความแรง 3,000 g, 10 นาที ล้างตะกอนของเชื้อที่ได้ด้วย 10 mM phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS) 2 ครั้ง นำเชื้อมากระจายตัวใน MEM ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ สำหรับการศึกษการยึดเกาะกับ Caco-2 cell และกระจายตัวใน DMEM ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ สำหรับการศึกษการยึดเกาะกับ HeLa cell โดยปรับเชื้อให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10⁹ cfu/มล.

13.6.8 การยึดเกาะของเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* sp. กับ Caco-2 cell และ HeLa cell

ใส่ Caco-2 cell 5×10^5 cell ลงในแต่ละหลุมของ 24 well tissue culture plate (Corning Inc, USA) ใส่อาหาร MEM นำไปเลี้ยงในตู้บ่มเพาะที่มีบรรยากาศซึ่งประกอบด้วยอากาศ 95% และ CO₂ 5% อุณหภูมิ 37 °C เปลี่ยนอาหารทุก 2-3 วัน ในระยะ 6 วันแรก และเปลี่ยนอาหารทุกวันหลังจากนั้นจนครบ 21 วัน ซึ่งเป็นระยะ late post confluence culture เพื่อให้เซลล์มีการ differentiate สร้าง microvilli ก่อนทำการทดสอบการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรีย สำหรับ HeLa cell นำเซลล์ 5×10^5 cell ใส่ลงในแต่ละหลุมของ 24 well tissue culture plate ใส่อาหาร DMEM นำไปเลี้ยงในตู้บ่มเพาะ ที่มีบรรยากาศซึ่งประกอบด้วย อากาศ 90% และ CO₂ 10% อุณหภูมิ 37 °C เปลี่ยนอาหารทุก 2 วัน ในระยะ 4 วันแรก และเปลี่ยนอาหารทุกวันหลังจากนั้นจนครบ 7 วัน ก่อนทำการทดสอบการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรีย

ก่อนทำการวิเคราะห์การยึดเกาะ ล้างผิวหน้าของเซลล์ด้วย PBS pH 7.2, 2 ครั้ง นำเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *B. subtilis* BS48 ที่มีปริมาณเชื้อ 10^8 cfu/มล. จำนวน 1 มล. ใส่ลงในแต่ละหลุมของเซลล์ที่เตรียมไว้ โดยทดสอบ 3 หลุม ต่อหนึ่งเชื้อ นำไปบ่มเพาะในตู้บ่มเพาะที่มีบรรยากาศซึ่งประกอบด้วยอากาศ 95% และ CO₂ 5% อุณหภูมิ 37 °C 1 ชม. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งไปล้างด้วย PBS pH 7.4, 2 ครั้งเพื่อกำจัดเชื้อที่ไม่ยึดเกาะทิ้งไป แล้วใส่ 0.05% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA) 1 มล. บ่มไว้ 10 นาที เพื่อให้ย่อยทำลายเซลล์ให้เชื้อที่เกาะหลุดออกมา นำเชื้อจากแต่ละหลุมมาใส่ใน half strength MRSB แล้วทำ 10-fold serial dilution นำแต่ละ dilution มา spread ลงบน MRSA แล้วบ่มเพาะในสภาวะ anaerobe ที่ 37 °C, 48 ชม. นับจำนวนเชื้อที่เกาะเซลล์ และศึกษาการเกาะของเซลล์ด้วยกล้อง inverted microscope และ scanning electron microscope (SEM)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ} = (N_1/N_0) \times 100$$

$$N_1 = \text{จำนวนเชื้อที่ยึดเกาะ}$$

$$N_0 = \text{จำนวนเชื้อที่ใส่ลงไปหลุม}$$

13.7 ความสามารถในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารและช่องคลอด

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งการยึดเกาะของแบคทีเรียก่อโรคกับเซลล์ลำไส้และเซลล์ช่องคลอดของคนทำตามวิธีของ Matijasić และคณะ (2006) ทำการเลี้ยง *Lactobacillus* spp. เซลล์ Caco-2 และ HeLa ใน 24-well culture plate เหมือนวิธีการที่กล่าวแล้วข้างต้น ส่วนเชื้อที่เป็นตัวแทนของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารคือ *Escherichia coli* โดยเลี้ยงเชื้อใน BHIB ส่วนเชื้อที่เป็นตัวแทน

ของเชื้อในช่องคลอดคือ *Gardnerella vaginalis* เลี้ยงใน BHIB เช่นเดียวกัน บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C, 24 ชม. นำเชื้อแบคทีเรียที่ใส่ทดสอบทุกชนิดมาล้างด้วย PBS pH 7.4, 2 ครั้ง ปรับความเข้มข้นของเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* LS48, *L. rhamnosus* GG, *E. coli*, *G. vaginalis* ให้ได้ 10^8 cfu/มล. กับ MEM หรือ DMEM ที่ไม่ใส่ยาปฏิชีวนะ

การทดสอบการเกิด competition ให้นำเชื้อ *Lactobacillus* spp. หรือ *B. subtilis* (500 มคล.) และเชื้อก่อโรค (500 มคล. ใส่ลงในหลุมของเซลล์ที่จะทดสอบพร้อมกัน (Ganon et al., 2004) แล้วบ่มไว้ที่ 37 °C, 30 นาที ล้างเชื้อที่ไม่เกาะออก 2 ครั้ง ด้วย PBS pH 7.4

การทดสอบการเกิด exclusion ใส่เชื้อ *Lactobacillus* spp. หรือ *B. subtilis* BS48 (500 มคล.) ลงในหลุมของเซลล์ที่จะทดสอบก่อน บ่มไว้ที่ 37 °C, 30 นาที แล้วล้างเชื้อที่ไม่เกาะออก 2 ครั้ง ด้วย PBS pH 7.4 ก่อนจะใส่เชื้อก่อโรค (500 มคล.) ลงไปบ่มไว้อีก 30 นาที แล้วล้างเชื้อที่ไม่เกาะออก 2 ครั้งด้วย PBS pH 7.4

การทดสอบ replacement ทำเช่นเดียวกับการทดสอบการเกิด exclusion แต่สลับให้เชื้อก่อโรคลงในเกาะกับเซลล์ก่อนแล้วจึงใส่เชื้อ *Lactobacillus* spp. หรือ *B. subtilis* BS48 ลงไปที่หลัง

จากการทดลองทั้ง 3 วิธี เมื่อล้างเชื้อที่ไม่ยึดเกาะออกแล้วให้ใช้ 0.05% (v/v) Triton X-100 นำเชื้อที่ยึดเกาะออกมาจากเซลล์ บ่มเพาะเชื้อแต่ละชนิดเพื่อนับจำนวนโคโลนี โดยเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* spp. ใน MRSA บ่มเพาะในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37°C, 24-48 ชม., *Escherichia coli* เลี้ยงใน MaConkey agar ส่วน *Gardnerella vaginalis* เลี้ยงใน BHIA ที่ใส่ 15 มก./มล. hemin บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C, 24-48 ชม. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของเชื้อแต่ละชนิด

14. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

ผลจากการทดลองแต่ละการศึกษาจะแสดงในรูปของค่าเฉลี่ยจากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ ค่าความคลาดเคลื่อน (variation) แสดงด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) และใช้ Student's t test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น $P < 0.05$

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลจากการเก็บตัวอย่างดิน ตะกอนตมและสัตว์น้ำจากป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส

ตัวอย่างดินและตะกอนตมที่เก็บได้จากจุดต่าง ๆ ของป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส จำนวน 50 ตัวอย่าง ประกอบไปด้วยดินแห้ง 32 ตัวอย่าง และดินที่เป็นตะกอนตม 18 ตัวอย่าง ลักษณะของดินในป่าพรุโต๊ะแดงเกิดจากการทับถมของซากพืชซากสัตว์ทั้งบนพื้นดินและในน้ำมาเป็นเวลายาวนาน ดินจึงมีความอุดมสมบูรณ์ของสารอินทรีย์สูง เป็นแหล่งอาหารและเป็นที่อยู่อาศัยของพืชและสัตว์ รวมถึงจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์

ในป่าพรุโต๊ะแดงมีสัตว์อาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก ทั้งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก สัตว์เลื้อยคลาน สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำและสัตว์น้ำ เช่น ปลา ปู กุ้ง หอย จากการเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำที่อาศัยอยู่ในป่าพรุโต๊ะแดงได้ตัวอย่างสัตว์น้ำทั้งหมด 100 ตัวอย่าง ประกอบด้วยปลา 78 ตัวอย่าง กุ้ง 11 ตัวอย่าง หอย 3 ตัวอย่าง ปลาที่จับได้บางชนิดเป็นปลาประจำถิ่นที่มีอยู่เฉพาะที่ ป่าพรุโต๊ะแดงเท่านั้น เช่นปลาตุกรำพัน (*Clarias nieuhofii*) และปลากะแมะ (*Chaca bankanensis*)

จากตัวอย่างดิน ตะกอนตม และจากสัตว์น้ำที่ได้จากป่าพรุโต๊ะแดงได้นำมาแยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยเฉพาะ *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* spp. และนำมาศึกษาคุณสมบัติของความเป็นโปรไบโอติก เพื่อใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในปลาเศรษฐกิจ หรืออาจจะพัฒนามาใช้เป็นโปรไบโอติกในคน ดังรายละเอียดที่ได้กล่าวถึงต่อไป

2. ผลการแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* spp. จากดิน ตะกอนตมและทางเดินอาหารของสัตว์น้ำจากป่าพรุโต๊ะแดง

Lactobacillus spp.

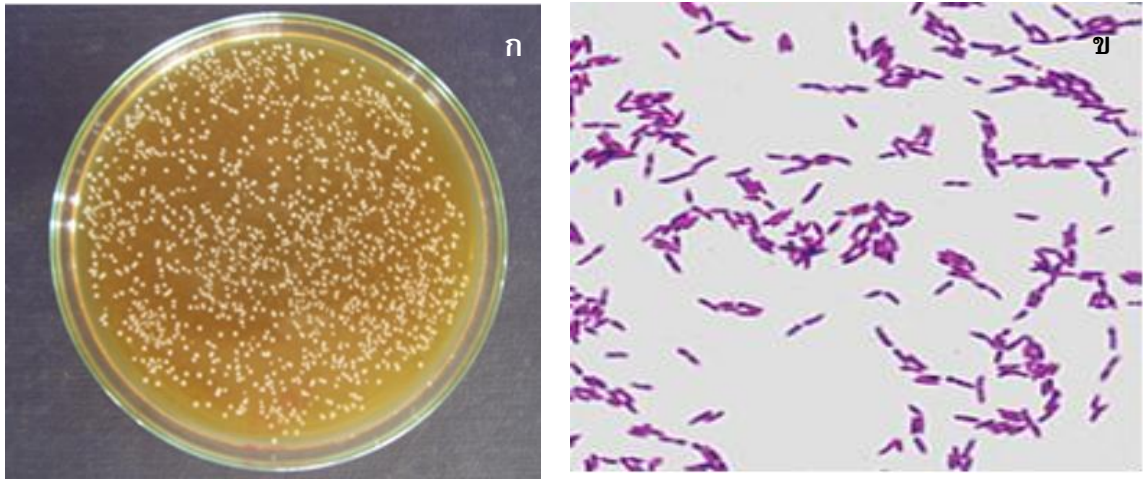
ในการศึกษารั้งนี้ได้แยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากดิน ตะกอนตมและทางเดินอาหารของสัตว์น้ำจากป่าพรุโต๊ะแดงได้ 200 isolate เมื่อนำเชื้อมาเลี้ยงบนอาหาร de Man Rogosa and Sharpe agar (MRSA) ซึ่งเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* spp. พบว่าโคโลนีที่เจริญเติบโตบนอาหารดังกล่าวมีลักษณะกลมมนและมีสีขาวดังแสดงในรูปที่ 3.1 ก ได้นำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้น โดยการย้อมแกรม และทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) จากผลการทดสอบได้คัดเลือกเชื้อที่ติดสีแกรมบวก รูปแท่ง ดังแสดงในรูปที่ 3.1 ข และให้ผลคะตะเลสเป็นลบ ซึ่งเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ได้ 150 isolate โดยเป็นเชื้อจากดินและตะกอนตม 68 isolate ให้รหัสเป็น *Lactobacillus* LS1-LS68 (L = *Lactobacillus*, S = Soil เพื่อให้ทราบว่ามีที่มาจากดินหรือตะกอนตม) และเป็นตัวอย่างจากสัตว์น้ำ 82 isolate ให้รหัสเป็น *Lactobacillus* LF1-LF82 (F = Fish เพื่อให้ทราบที่มาจากทางเดินอาหารของปลาหรือสัตว์น้ำ) ดังผลสรุปในตารางที่ 3.1

***Bacillus* spp.**

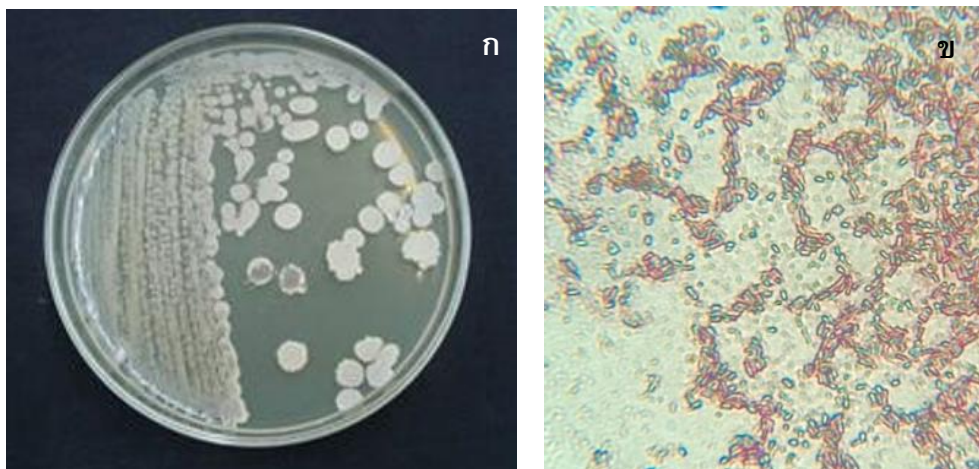
ผลจากการแยกเชื้อจากดิน ตะกอนตม และจากสัตว์น้ำ จากป่าพรุโต๊ะแดง ได้เชื้อ 182 isolate ที่อาจจะเป็นเชื้อ *Bacillus* spp. นำเชื้อมาย้อมแกรม ย้อมสปอร์ และทดสอบการสร้างเอนไซม์อะตาเลส (catalase) จากผลการทดสอบได้คัดเลือกเชื้อที่เป็นรูปแท่ง ติดสีแกรมบวก ให้ผลอะตาเลสเป็นบวก และสร้างสปอร์ได้ 122 isolate เมื่อนำมาเลี้ยงบน brain heart infusion agar (BHIA) จะได้โคโลนีสีขาว ขอบเป็นหยักดังแสดงในรูปที่ 3.2 (ก) และเมื่อทำการย้อมสปอร์จะเห็นตัวเซลล์ติดสีแดงและสปอร์ติดสีเขียวดังแสดงในรูปที่ 3.2 (ข) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นของ *Bacillus* spp. โดยเป็นเชื้อจากดินและตะกอนตม 98 isolate ให้รหัสเป็น *Bacillus* BS1-BS98 (B = *Bacillus*, S = Soil เพื่อให้ทราบว่ามีที่มาจากดินหรือตะกอนตม) และเป็นตัวอย่างจากสัตว์น้ำ 24 isolate ให้รหัสเป็น *Bacillus* BF1-BF24 (F = Fish เพื่อให้ทราบที่มาจากทางเดินอาหารของปลาหรือสัตว์น้ำ) ดังผลสรุปที่แสดงในตารางที่ 3.1

3. ความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของปลาและของคนของเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* pp. ที่แยกได้

เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของปลา 2 ชนิดคือ *Aeromonas hydrophila* 3 เชื้อ และ *Streptococcus agalactiae* 2 เชื้อ ที่มีที่มาจากต่างกัน และเชื้อก่อโรคในคน 7 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* และ *Shigella sonnei* ของเชื้อ *Lactobacillus* spp. จำนวน 150 isolate และเชื้อ *Bacillus* spp. 122 isolate ที่แยกได้ โดยใช้ spot method จากผลที่แสดงในตารางที่ 3.2 พบว่า เชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่ไม่สามารถฆ่าเชื้อก่อโรคในสัตว์และในคนได้คือไม่เกิด inhibition zone 135 isolate และฆ่าเชื้อได้บางชนิดและมีฤทธิ์ปานกลางคือมี inhibition zone อยู่ในช่วง 7-12 มม. จำนวน 13 isolate และสามารถฆ่าเชื้อทุกชนิดได้ดีมากคือมี inhibition zone อยู่ในช่วง 12-19 มม. จำนวน 2 isolates เป็นเชื้อที่แยกได้จากดิน 1 isolate คือ *Lactobacillus* LS7 และเชื้อที่แยกได้ปลา 1 isolate คือ *Lactobacillus* LF8 ส่วนเชื้อ *Bacillus* spp. ที่ไม่สามารถฆ่าเชื้อก่อโรคในปลาและในคนได้มี 121 isolate ฆ่าเชื้อทุกชนิดได้ดีมากคือมี inhibition zone อยู่ในช่วง 12-19 มม. จำนวน 1 isolate เป็นเชื้อที่แยกได้จากดิน คือ *Bacillus* BS48



รูปที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Lactobacillus* spp. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ de Man Rogosa and Sharpe agar (ก), รูปร่างของเชื้อเป็นรูปแท่ง ติดสีแกรมบวก (ข)



รูปที่ 3.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Bacillus* spp. บนอาหาร brain heart infusion agar (ก), รูปร่างของตัวเชื้อเป็นรูปแท่ง ติดสีแดง และสปอร์ย้อมติดสีเขียวจากการย้อมสปอร์ (ข)

ตารางที่ 3.1 ผลการแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* spp. จากดินและตะกอนตม 50 ตัวอย่างและจากสัตว์น้ำ 100 ตัวอย่าง จากป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส ได้ *Lactobacillus* spp. 150 isolate และ *Bacillus* spp. 122 isolate

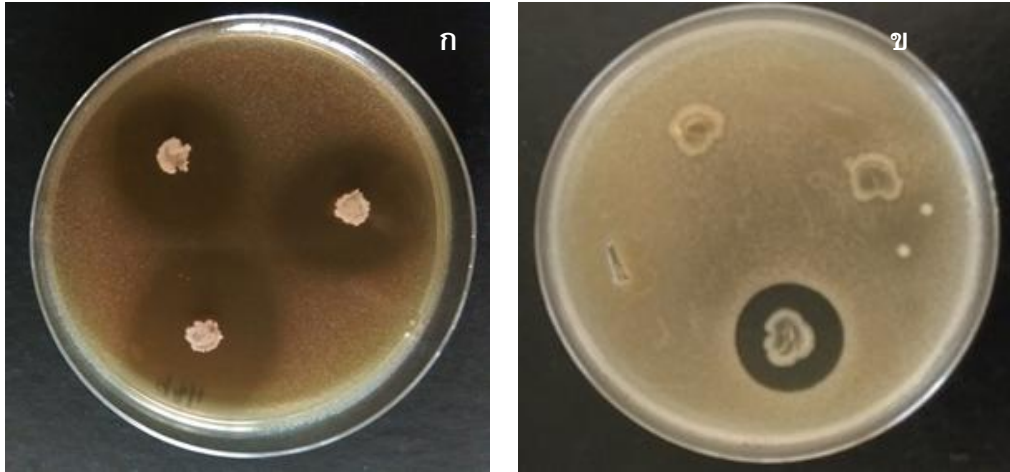
แหล่งที่มาของเชื้อและเชื้อ	จำนวน isolate	รหัสของ isolate
ดินและตะกอนตม		
<i>Lactobacillus</i> spp.	68	LS1-LS68
<i>Bacillus</i> spp.	98	BS1-BS98
สัตว์น้ำ ปลา กุ้ง หอย		
<i>Lactobacillus</i> spp.	82	LF1-LF82
<i>Bacillus</i> spp.	24	BF1-BF24

ตารางที่ 3.2 จำนวน isolate ของ *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* spp. ที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลาและเชื้อก่อโรคในคนด้วย spot method (จำแนกกลุ่มจากขนาดของ inhibition zone)

เชื้อก่อโรค	<i>Lactobacillus</i> spp.			<i>Bacillus</i> spp.		
	Inhibition zone (มม.)			Inhibition zone (มม.)		
	ไม่มี	7-12	12-19	ไม่มี	7-12	12-19
เชื้อก่อโรคในปลา						
<i>A. hydrophila</i> -1	137	11	2*	121	0	1**
<i>A. hydrophila</i> -2	135	13	2*	121	0	1**
<i>A. hydrophila</i> -3	136	12	2*	120	1	1**
<i>S. agalactiae</i> -1	139	9	2*	120	1	1**
<i>S. agalactiae</i> -2	137	11	2*	121		1**
เชื้อก่อโรคในคน						
<i>S. aureus</i>	139	9	2*	121	0	1**
<i>P. aeruginosa</i>	141	7	2*	121	0	1**
<i>S. Typhimurium</i>	142	6	2*	121	0	1**
<i>V. cholerae</i>	141	6	2*	121	0	1**
<i>E. coli</i>	137	10	2*	120	1	1**
<i>S. sonnei</i>	136	11	2*	121	0	1**
<i>G. vaginalis</i>	137	10	2*	121	0	1**

* = *Lactobacillus* LS7 และ *Lactobacillus* LF8

** = *Bacillus* BS48



รูปที่ 3.3 Inhibition zone รอบ ๆ spot ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. (ก), และ *Bacillus* sp. (ข) ที่แยกได้จากดินต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก่อโรคปลาด้วย spot method

4. การจำแนกเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* sp. ด้วยการทำให้ 16S rDNA sequencing

จากความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลาและเชื้อก่อโรคในคนได้ดี ของเชื้อ 3 isolate ที่แยกได้คือ *Lactobacillus* LS7, *Lactobacillus* LF8 และ *Bacillus* BS48 จึงได้ทำการ identify เชื้อเพื่อให้ทราบชื่อในระดับสปีชีส์ ด้วยการใช้เทคนิคทาง molecular biotechnology ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA และนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายพันธุ์ของเชื้อมาตรฐานใน data base เพื่อให้ทราบถึงสปีชีส์ของเชื้อที่แยกได้ ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

***Lactobacillus* LS7: มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ (5'-3')**

```
CTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAAC
TGGTGAGTAACACGCTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCT
TCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCTATTAGCTAGATGGTGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGG
GACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCG
TAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAAGTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTA
GGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAA
ACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGGCGGTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTG
AGGCTCGAAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACG
CATTAAAGCATTCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAG
AACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGACCTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAAGGTGGGGATGACGTCAA
ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAAGTCCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATT
GTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACACACCGCCCGTACACCATGAG
AGTTTGTAAACACAAGGACAA
```

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียใน data base พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus pentosus* มากที่สุดคือ 99.72% ดังผลเปรียบเทียบที่แสดงในตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 เปรอ์เซ็นต์ความเหมือนของ 16s rDNA เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับเชื้อ

Lactobacillus LS7

Rank	Name	Strain	Authors	Accession	Pairwise Similarity (%)	Diff/Total nt
1	<i>Lactobacillus pentosus</i>	JCM 1558(T)	(ex Fred et al. 1921) Zononi et al. 1987	D79211	99.72	4/1434
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	ATCC 14917(T)	(Orla-Jensen 1919) Bergey et al. 1923	ACGZ01000098	99.65	5/1439
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i>	DKO 22(T)	Bringel et al. 2005	AJ640078	99.58	6/1425
4	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	DSM 10667(T)	Curk et al. 1996	AJ306297	99.51	7/1436
5	<i>Lactobacillus fabifermentans</i>	DSM 21115(T)	De Bruyne et al. 2009	AYGX01000583	98.96	15/1439
6	<i>Lactobacillus xiangfangensis</i>	3.1.1(T)	Gu et al. 2012	HM443954	98.78	17/1395
7	<i>Lactobacillus plajomi</i>	NB53(T)	Miyashita et al. (in press)	AB907190	98.47	22/1434
8	<i>Lactobacillus mudanjiangensis</i>	11050(T)	Gu et al. 2013	HF679037	98.35	23/1394
9	<i>Lactobacillus modestisalitolerans</i>	NB466(T)	Miyashita et al. (in press)	AB907192	98.26	25/1433
10	<i>Lactobacillus koreensis</i>	DCY50(T)	Bui et al. 2011	FJ904277	94.98	72/1434

***Lactobacillus* LF8: มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ (5'-3')**

TCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCCTGCATCATGATTACATTTGAGTGA
 GTGGCGAACTGGTGAGTAACACGCTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCCGATG
 GTCCGAGCTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCTATTAGCTAGATGGTGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTA
 GCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTC
 TGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCCAGTATTGACGGT
 ATTTAACGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGCGTAAAGCGAGCGCAG
 GCGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATG
 TGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAA
 ACAGGATTAGATACCTGAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCACTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCC
 GCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGA
 ACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTG
 TGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
 GAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCCAACTCGCGAGAGTAAG
 CTAATCTTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT
 ACGTTCGCCGGCCTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGG

เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียใน data base พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus plantarum* มากที่สุดคือ 100% ดังผลเปรียบเทียบที่แสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 เปรอ์เซ็นต์ความเหมือนของ 16s rDNA เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับเชื้อ

Lactobacillus LF8

Rank	Name	Strain	Authors	Accession	Pairwise Similarity (%)	Diff/Total nt
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	ATCC 14917(T)	(Orla-Jensen 1919) Bergey et al. 1923	ACGZ01000098	100.00	0/1441
2	<i>Lactobacillus pentosus</i>	JCM 1558(T)	(ex Fred et al. 1921) Zononi et al. 1987	D79211	99.93	1/1437
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i>	DKO 22(T)	Bringel et al. 2005	AJ640078	99.79	3/1428
4	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	DSM 10667(T)	Curk et al. 1996	AJ306297	99.72	4/1439
5	<i>Lactobacillus fabifermentans</i>	DSM 21115(T)	De Bruyne et al. 2009	AYGX01000583	99.17	12/1441
6	<i>Lactobacillus xiangfangensis</i>	3.1.1(T)	Gu et al. 2012	HM443954	99.00	14/1398
7	<i>Lactobacillus plajomi</i>	NB53(T)	Miyashita et al. (in press)	AB907190	98.82	17/1437
8	<i>Lactobacillus modestisalitolerans</i>	NB466(T)	Miyashita et al. (in press)	AB907192	98.61	20/1436
9	<i>Lactobacillus mudanjiangensis</i>	11050(T)	Gu et al. 2013	HF679037	98.57	20/1397
10	<i>Lactobacillus koreensis</i>	DCY50(T)	Bui et al. 2011	FJ904277	95.13	70/1437

Bacillus BS48: มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ (5'-3')

TCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG
GTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGCATGGTTCAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAG
ATGGACCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGCGCAGCATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGCTGACGGAGCAACCGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAGCTCTGTTGTTA
GGGAAGACAAGTACCGTTGGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTAGTGGCAAGCGTT
GTCCGGAATTATTGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAACCTGGGGAACTTGAGTGACG
AAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGAACACAGTGGCGAAGCGACTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGAGCGAAAGC
GTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGTCGACGTAACGCATTAAGCACTC
CGCTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGG
TCTTGACATCCTCTGACAATCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGTTGTCTGACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCTTGTATCTAGTTCGACGATTCAGTTGGGACTCTAAGTGACTGCCGGTGACAACCGGAGGAAGGTGGGGTACGTCAAATCATCATGCC
CCTTATGACTGGGTACACAGCTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGTTAAGCCAATCCCAAACTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCA
ACTCGACTCGGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGT TCCC GGGCCTTGATACACCGCCCGTACACCACGAGAG

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียใน data base พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *Bacillus subtilis* มากที่สุดคือ 99.95% ดังผลเปรียบเทียบที่แสดงในตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 เปรอ์เซ็นต์ความเหมือนของ 16s rDNA เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับเชื้อ

Bacillus B48

Rank	Name	Strain	Authors	Accession	Pairwise Similarity (%)	Diff/Total nt
1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	NCIB 3610(T)	(Ehrenberg 1835) Nakamura et al. 1999	ABQL01000001	99.93	1/1403
2	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inoquosorum</i>	KCTC 13429(T)	Rooney et al. 2009	AMXN01000021	99.86	2/1403
3	<i>Bacillus tequilensis</i>	KCTC 13622(T)	Gatson et al. 2006	AYTO01000043	99.86	2/1403
4	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	KACC 13105(T)	Madhaiyan et al. 2010	JTKJ01000077	99.71	4/1403
5	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	NRRL B-29049(T)	Nakamura et al. 1999	CP002905	99.71	4/1403
6	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	DSM 8802(T)	Delaporte and Sasson 1967	AM747812	99.71	4/1403
7	<i>Bacillus mojavensis</i>	RO-H-1(T)	Roberts et al. 1994	JH600280	99.64	5/1403
8	<i>Bacillus siomensis</i>	KCTC 13613(T)	Sumpavapoi et al. 2010	AJVF01000043	99.64	5/1403
9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	FZB42(T)	Borris et al. 2011	CP000960	99.57	6/1403
10	<i>Bacillus vallismortis</i>	DV1-F-3(T)	Roberts et al. 1996	JH600273	99.50	7/1403
11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>amyloliquefaciens</i>	DSM 7(T)	Borris (ex Fukumoto 1943) Priest et al. 1987	FN597644	99.43	8/1403
12	<i>Bacillus atrophaeus</i>	JCM 9070(T)	Nakamura 1989	AB021181	99.29	10/1399
13	<i>Bacillus vanillee</i> (invalid name)	XY18(T)	Chen et al. 2014	KF986320	99.18	11/1339
14	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580(T)	(Weigmann 1898) Chester 1901	AE017333	98.36	23/1403
15	<i>Bacillus sonorensis</i>	NBRC 101234(T)	Palmisano et al. 2001	AYTN01000016	98.15	26/1403
16	<i>Bacillus oerius</i>	24K(T)	Shivaji et al. 2006	AJ831843	98.14	26/1401
17	<i>Bacillus aerophilus</i>	28K(T)	Shivaji et al. 2006	AJ831844	97.36	37/1402
18	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b(T)	Shivaji et al. 2006	ASJ001000029	97.36	37/1402
19	<i>Bacillus stratosphericus</i>	41KF2a(T)	Shivaji et al. 2006	AJ831841	97.36	37/1402
20	<i>Bacillus xiamenensis</i>	HYC-10(T)	Lai et al. 2014	AMS010000114	97.29	38/1402
21	<i>Bacillus safensis</i>	FO-36b(T)	Satomi et al. 2006	ASJ001000027	97.15	40/1402
22	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061(T)	Meyer and Gotthel 1901	ABRX01000007	97.08	41/1402
23	<i>Bacillus aquimaris</i>	TF-12(T)	Yoon et al. 2003	AF483625	96.07	55/1399

จากผลการจำแนกเชื้อ *Lactobacillus* LS7, *Lactobacillus* LF8 และ *Bacillus* BS48 ได้ให้ชื่อใหม่เป็น *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8 และ *B. subtilis* BS48 ตามลำดับ โดยจะใช้ชื่อนี้ในการทดลองในหัวข้อต่อ ๆ ไป ซึ่งผลการทดลองในหัวข้อต่อไปนี้จะเป็นการศึกษาคุณสมบัติของความเป็นโปรไบโอติกของเชื้อทั้ง 3 ตัวนี้ โดยศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ที่ใช้ทำลายเชื้อก่อโรคในปลาที่ผลิตออกมา เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก สารออกฤทธิ์ที่เป็นโปรตีนหรือ bacteriocin และ hydrogen peroxide, ความไวต่อยาปฏิชีวนะ ความสามารถในการยึดเกาะกับเมือกจากทางเดินอาหารของปลา และ เมื่อกักติดตัวปลาความสามารถในการแย่งกันยึดเกาะกับเมือกในทางเดินอาหารของปลากับเชื้อก่อโรคในปลา

ความสามารถในการเกาะกลุ่มกับเชื้อก่อโรค ความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์ ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม ความสามารถในการทนต่อสภาวะที่รุนแรงในทางเดินอาหารของปลา ซึ่งในการทดลองต่าง ๆ เหล่านี้ได้ใช้เชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* GG ซึ่งเป็นโพรไบโอติกที่สำคัญที่ใช้ป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในคน เป็นตัวเปรียบเทียบ ควบคู่กันไป

5. การศึกษาสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8 และ *B. subtilis* BS48

5.1 ความสามารถในการสร้างกรดแลคติก (lactic acid), กรดอะซิติก (acetic acid) และ hydrogen peroxide

จากตารางที่ 3.6 พบว่าเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8 สามารถสร้างกรดแลคติกและกรดอะซิติกได้ปริมาณใกล้เคียงกันและเมื่อเปรียบเทียบกับ *L. rhamonosus* GG จะเห็นว่าเชื้อนี้ผลิตกรดแลคติกได้สูงกว่า แต่ผลิตกรดอะซิติกได้ใกล้เคียงกัน ส่วน *B. subtilis* BS48 ไม่สร้างทั้งกรดแลคติกและกรดอะซิติก เชื้อ *Lactobacillus* spp. จะสร้างกรดแลคติกและกรดอะซิติกภายในเซลล์จากการสลายสารคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate catabolism) (Magni et al., 1999) โดยผ่านกระบวนการ homofermentative หรือ heterofermentative Nagoba และคณะ (2008) รายงานว่ากรดอะซิติก 0.5% (v/v) สามารถกำจัดเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ได้ และที่ความเข้มข้น 0.25-0.5% (v/v) สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ (Landis, 2008) ดังนั้นฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อของ *L. pentosus* LS7 และ *L. plantarum* LF8 ส่วนหนึ่งมาจากกรดแลคติกและกรดอะซิติกที่สร้างขึ้น ส่วน *B. subtilis* BS48 คาดว่าออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อด้วยสารอย่างอื่นที่ไม่ใช่กรดแลคติกหรือกรดอะซิติก

ผลจากการตรวจสอบความสามารถในการผลิต hydrogen peroxide (H_2O_2) ของเชื้อที่แยกได้ทั้ง 3 ตัวและเชื้อ *L. rhamnosus* GG ดังแสดงในตารางที่ 3.6 พบว่าเชื้อ *Lactobacillus* spp. ทุกตัวสามารถผลิต H_2O_2 ได้ในปริมาณที่สูง เนื่องจากโคโลนีของเชื้อบนอาหารที่ใช้ทดสอบมีสีน้ำเงิน ส่วนเชื้อ *B. subtilis* BS48 ผลิต H_2O_2 ได้ปานกลางเนื่องจากโคโลนีบนอาหารที่ทดสอบมีสีน้ำตาล H_2O_2 เป็นสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อของ *Lactobacillus* spp. แต่อย่างไรก็ตามมีเชื้อเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถผลิต H_2O_2 ได้ *Lactobacillus* spp. ที่ผลิต H_2O_2 ได้จะใช้ flavoproteins เปลี่ยนออกซิเจนเป็น H_2O_2 และเนื่องจากเชื้อไม่มี heme protein catalase จึงทำให้มี H_2O_2 สะสมในปริมาณที่มากเกินไปที่เชื้อจะสลายได้หมด ดังนั้น H_2O_2 ที่เกิดขึ้นจึงสามารถฆ่าเชื้ออื่นได้โดยเฉพาะเชื้อที่ไม่มี H_2O_2 -scavenging enzymes เช่น catalase, peroxidase (Mosbah and Mosbah, 2009) ดังนั้นสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของปลาในครั้งนี้ส่วนหนึ่งจะมาจากฤทธิ์ของ H_2O_2 ร่วมด้วย

ตารางที่ 3.6 ปริมาณกรดแลคติกและกรดอะซีติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG ใน MRSB บ่มเพาะในสภาวะ anaerobe ที่อุณหภูมิ 37 °C, 48 ชม. และ *Bacillus subtilis* BS48 ที่เลี้ยงใน BHIB บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 °C, 48 ชม. และความสามารถในการสร้าง hydrogen peroxide ของเชื้อทั้ง 3 ชนิด

เชื้อ	ปริมาณ (มก./มล.)±SD		ระดับการสร้าง hydrogen peroxide
	กรดแลคติก	กรดอะซีติก	
<i>L. pentosus</i> LS7	4.21±0.39	2.63±0.27	*3+
<i>L. plantarum</i> LF8	3.91±0.21	2.21±0.33	3+
<i>B. subtilis</i> BS48	0.0	0.0	2+
<i>L. rhamnosus</i> GG	6.5±0.19	2.91±0.02	3+

*3+, 2+, 1+, - คือระดับความสามารถในการสร้าง hydrogen peroxide สูง, ปานกลาง, น้อย, และไม่สร้าง ตามลำดับ

5.2 ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อที่อาจจะเป็นโปรตีนหรือแบคทีริโอซิน

จากตารางที่ 3.7 เมื่อนำสารที่เชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *B. subtilis* BS48 สร้างขึ้นแล้ว lyophilize ให้เป็นผงแห้ง แล้วละลายน้ำให้มีความเข้มข้นเป็น 50x ของความเข้มข้นเดิม แบ่งเป็นแต่ละส่วนไปย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน หรือนำไปให้ความร้อนเพื่อดูว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของปลาลดลงหรือไม่ พบว่า *L. pentosus* LS7 และ *B. subtilis* BS48 ออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนและเมื่อถูกความร้อน ซึ่งสังเกตได้จากขนาดของ inhibition zone ที่ลดลง ลักษณะของ inhibition zone ดังแสดงในรูปที่ 3.4 ส่วนเชื้อ *L. plantarum* LF8 และ *L. rhamnosus* GG ขนาดของ inhibition zone ลดลงเล็กน้อย ซึ่งจากผลที่ได้นี้อาจจะกล่าวได้ว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อของ *L. pentosus* LS7 มาจากฤทธิ์ของกรดแลคติก กรดอะซีติก และ short chain fatty acids อื่น ๆ ที่ไม่ได้ตรวจวัด H₂O₂ และสารพวกโปรตีนหรือสาร bacteriocin ที่ไวต่อการทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนและความร้อน ส่วน *L. plantarum* LF8 นั้นอาจจะไม่สร้างสารยับยั้งเชื้อประเภทโปรตีน ดังนั้นฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อเกิดจากกรดแลคติก กรดอะซีติก short chain fatty acids และ H₂O₂ เพียงส่วนเดียว ส่วน *L. rhamnosus* GG เป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อนี้ไม่ได้สร้างสาร bacteriocin (Yan and Polk, 2012) แต่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้ออื่นได้ดีเพราะฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อเกิดจากกรดแลคติก กรดอะซีติก และ short chain fatty acids อื่น ๆ และ H₂O₂ ที่มีปริมาณสูง เช่นเดียวกับ *L. plantarum* LF8



รูปที่ 3.4 Inhibition zone ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Bacillus subtilis* BS48 ต่อเชื้อก่อโรคในปลา *Aeromonas hydrophila*

ตารางที่ 3.7 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนและความร้อนต่อสารชีวภาพที่ผลิตโดย *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8, *Bacillus subtilis* LS48 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG ที่ความเข้มข้น 50x ของความเข้มข้นตั้งต้น ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลา *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae*

เชื้อที่ผลิตสาร/เชื้อก่อโรค	Inhibition zone (มม.)±SD				
	สารที่ผลิตจากเชื้อ 50x	ย่อยด้วย proteinase K (1 มก./มล.)	ย่อยด้วย pepsin (1 มก./มล.)	ความร้อน (°C)	
				100 15 นาที	121 ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที
<i>L. pentosus</i> LS7					
<i>A. hydrophila</i>	16.32±0.07	*12.12±0.42	*12.32±0.44	14.32±0.32	*12.32±0.31
<i>S. agalactiae</i>	17.35±0.42	*13.32±0.53	*11.32±0.27	15.32±0.47	*11.32±0.47
<i>L. plantarum</i> LF8					
<i>A. hydrophila</i>	15.12±0.43	13.35±0.62	12.32±0.39	13.62±0.45	12.42±0.17
<i>S. agalactiae</i>	15.32±0.53	12.62±0.47	13.32±0.48	13.52±0.47	12.62±0.27
<i>B. subtilis</i> BS48					
<i>A. hydrophila</i>	16.82±0.47	*12.32±0.53	*10.32±0.47	*12.82±0.42	*12.32±0.69
<i>S. agalactiae</i>	17.42±0.38	*12.32±0.37	*11.62±0.39	*12.20±0.45	*11.42±0.52
<i>L. rhamnosus</i> GG					
<i>A. hydrophila</i>	16.82±0.47	16.52±0.43	16.32±0.57	15.82±0.42	14.32±0.69
<i>S. agalactiae</i>	17.89±0.42	17.26±0.58	17.08±0.89	16.23±0.59	16.02±0.88

* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับสารที่ไม่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนหรือความร้อน ($p < 0.05$)

6. การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ

จากการศึกษาความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะพบว่า *L. pentosus* LS7 และ *L. plantarum* LF8 ไวต่อยาปฏิชีวนะและทนต่อยาปฏิชีวนะเหมือนกันคือ ไวต่อ Bacitracin, Cefoperazone, Cefazidime, Cephalotin, Penicillin G และทนต่อ Ampicillin, Kanamycin, Norfloxacin, Polymyxin B, และ Streptomycin ส่วน *B. subtilis* BS48 ไวต่อ Ampicillin, Bacitracin, Cefoperazone, Ceftazidime, Cephalotin, Penicillin G, Polymyxin B และทนต่อยา Kanamycin, Norfloxacin และ Streptomycin ดังแสดงในตารางที่ 3.8 เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียอาจจะเป็นแหล่งของยีนดื้อยาถ่ายทอดไปยังแลคติกแอซิดแบคทีเรียอื่นหรือเชื้อก่อโรคได้ อย่างไรก็ตามมีการศึกษาที่ชี้ให้เห็นว่า ยีนดื้อยาเป็นลักษณะเฉพาะตัวที่ไม่ส่งต่อไปยังแบคทีเรียอื่น (Salminen et al., 1998) ถ้าเชื้อโพรไบโอติกที่ดื้อยาและไม่ถ่ายทอดยีนดื้อยาไปยังเชื้ออื่นก็จะเป็นข้อดี ที่จะสามารถใช้โพรไบโอติกนั้นได้อย่างปลอดภัยและสามารถใช้ร่วมกับการใช้ยาปฏิชีวนะได้ (Cebeci and Gürakan, 2003)

ตารางที่ 3.8 แสดงค่าความไวของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8 และ *Bacillus subtilis* LS48 ต่อยาปฏิชีวนะ

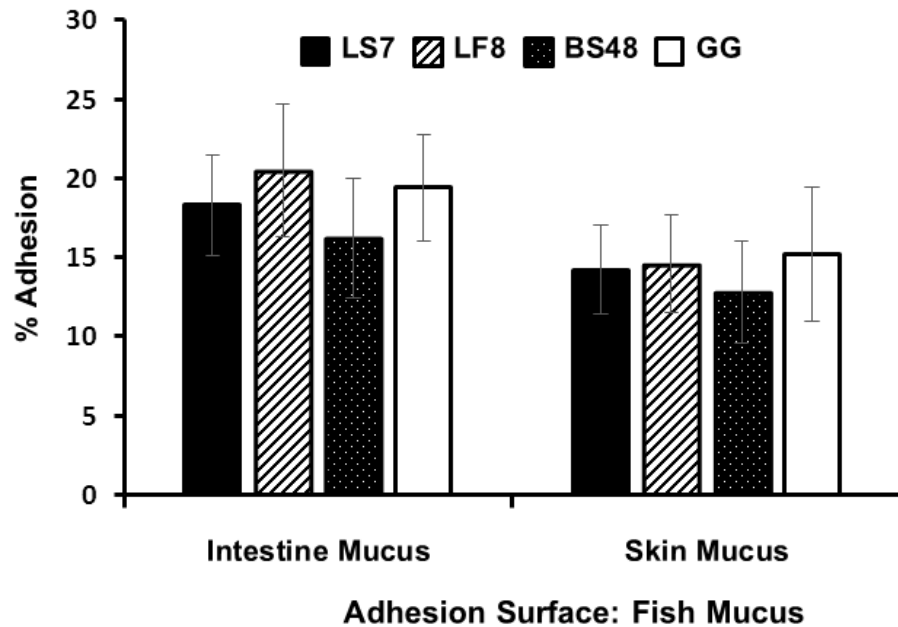
ยาปฏิชีวนะ	Inhibition zone (mm)		
	<i>L. pentosus</i> LS7	<i>L. plantarum</i> LF8	<i>B. subtilis</i> BS48
Ampicillin (10 µg)	R(-)	R(-)	S(23.2±0.3)
Bacitracin (10 unit)	S(14.3±0.2)	S(15.5±0.1)	S(14.3±0.3)
Cefoperazone (75 µg)	S(25.3±0.3)	S(20.3±0.3)	S(20.4±0.2)
Ceftazidime (30 µg)	S(25.2±0.3)	S(27.2±0.2)	S(25.2±0.4)
Cephalothin (30 µg)	S(20.4±0.4)	S(20.2±0.2)	S(20.2±0.5)
Kanamycin (30 µg)	R(-)	R(-)	R(10.3±0.3)
Norfloxacin (10 µg)	R(-)	R(-)	R(8.2±0.4)
Penicillin G (10 unit)	S(23.5±0.2)	S(25.3±0.4)	S(20.4±0.2)
Polymyxin B (300 unit)	R(-)	R(-)	S(25.3±0.2)
Streptomycin (10 µg)	R(-)	R(-)	R(-)

S = Sensitive, R = Resistance

7. ความสามารถในการยึดเกาะกับเมือกจากทางเดินอาหารของปลาและเมือกที่ติดตัวปลา

7.1 ความสามารถในการยึดเกาะกับเมือกจากทางเดินอาหารของปลาและเมือกที่ติดตัวปลา

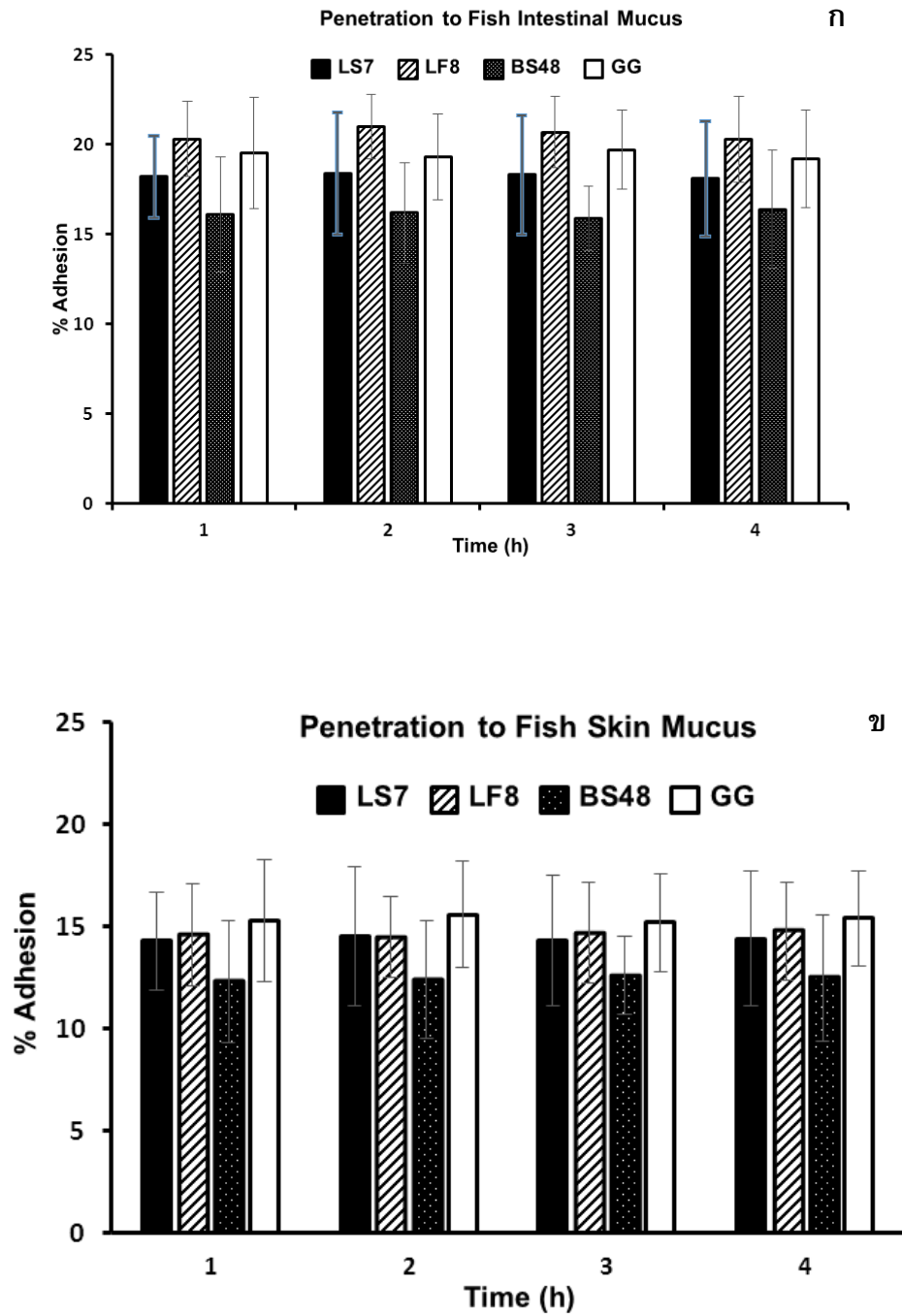
ความสามารถในการยึดเกาะของ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamnosus* GG กับเมือกที่ติดตัวปลานิลเท่ากับ 18.3, 20.5, 16.2 และ 19.4% ตามลำดับเมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อที่ใส่ลงไปให้ยึดเกาะทั้งหมด และความสามารถในการยึดเกาะกับเมือกจากผิวหนังของปลานิลเท่ากับ 14.2, 14.6, 12.8 และ 15.2% ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3.5 การยึดเกาะที่จำเพาะเจาะจงของเชื้อโพรไบโอติกต่อเมือกของปลาเป็นสิ่งสำคัญในการกำจัดเชื้อก่อโรคด้วยกลไก competitive exclusion (Bengmark, 1998; Ouwehand et al., 1999) การยึดเกาะเมือกเป็นขั้นตอนการเริ่มต้นของการเกิด colonization (Ouwehand et al., 1999) มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า การยึดเกาะของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากปลา ได้แก่ *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus lactis* และ *Leuconostoc mesenteroides* สามารถป้องกันการเกิดโรค furunculosis ในปลา rainbow trout ได้ (Balcázar et al., 2007) และการเกาะของเชื้อที่ mucosa ของลำไส้เล็กเป็นการส่งเสริมการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย (Nikoskelainen et al., 2003) Balcázar และคณะ 2007 พบว่าการเกิด colonization ของเชื้อที่ได้จากปลาจะสัมพันธ์กับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน humoral immune response ที่ไม่เจาะจง เช่น เกิดการกระตุ้นการทำงานของ complement และการทำงานของ lysozyme นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อโพรไบโอติกของคน ได้แก่ *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, *L. bulgaricus*, *L. johnsonii* La1, และ *L. lactis* Bb12 สามารถเกาะกับเมือกของปลาได้เช่นเดียวกับการเกาะกับเมือกจากลำไส้ของคน (Ouwehand et al., 1999).



รูปที่ 3.5 ความสามารถในการยึดเกาะเมือกของปลาชนิดของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8, *Bacillus subtilis* BS48 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG กับเมือกจากลำไส้และเมือกที่ติดตัวปลา

7.2 ความสามารถในการแทรกตัวเข้าไปในเมือกจากทางเดินอาหารของปลาและเมือกที่ติดตัวปลา

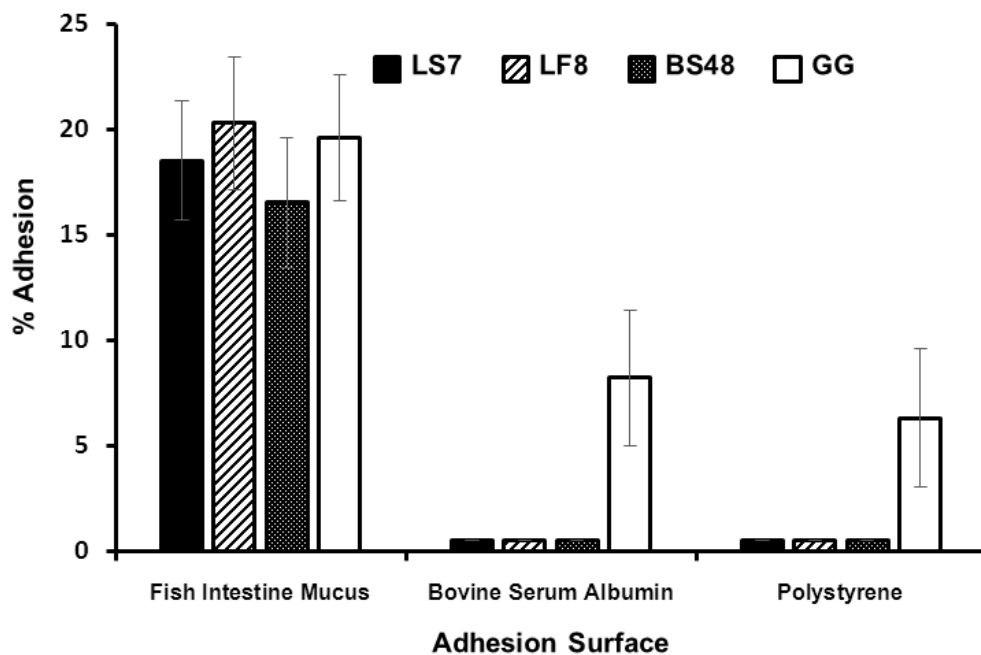
จากการทดลองการแทรกตัวของเชื้อเข้าไปในเมือกปลา จากรูปที่ 3.6 พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 1-4 ชม. เชื้อที่เกาะที่เมือกปลาทั้ง 4 เชื้อ ยังคงมีปริมาณเท่าเดิม แสดงว่าเชื้อไม่ได้แทรกตัวเข้าไปในเมือก คาดว่าเชื้อจะเกาะติดอยู่กับผิวของเมือกเท่านั้น โดยปริมาณของเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* B48 และ *L. rhamnosus* GG มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะที่เมือกจากลำไส้ของปลาเท่ากับ 18.2, 20.3, 16.1 และ 19.5% ตามลำดับ ส่วนที่ยึดเกาะที่เมือกที่ติดตัวปลา เท่ากับ 14.3, 14.6, 12.3 และ 15.3% ตามลำดับ ตลอดเวลา 4 ชม. ซึ่งถ้าเชื้อสามารถแทรกตัวเข้าสู่เมือกปลาได้สูงก็จะสามารถเกาะติดอยู่กับตัวของสัตว์ได้นาน ในการศึกษาการแทรกตัวเข้าไปในเมือกจากทางเดินอาหารของคน พบว่าเชื้อโพรไบโอติกของคนคือ *L. rhamnosus* ATCC 53103 และ *L. bulgaricus* สามารถแทรกเข้าสู่เมือกของคนได้ดี (Salas-Jara et al., 2016.) แต่ในการศึกษานี้พบว่าเชื้อที่แยกได้ทั้ง 3 ตัว และเชื้อ *L. rhamnosus* GG ไม่สามารถแทรกตัวเข้าไปในเมือกปลาได้



รูปที่ 3.6 ความสามารถในการแทรกตัวเข้าไปในเมือกจากลำไส้ (ก), และเมือกที่ติดตัวปลา (ข) ของปลาไนล์โดยเชื้อ *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8, *Bacillus subtilis* BS48 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG

7.3 การทดสอบว่าเชื้อยึดเกาะกับเมือกของปลาแบบจำเพาะเจาะจงหรือไม่

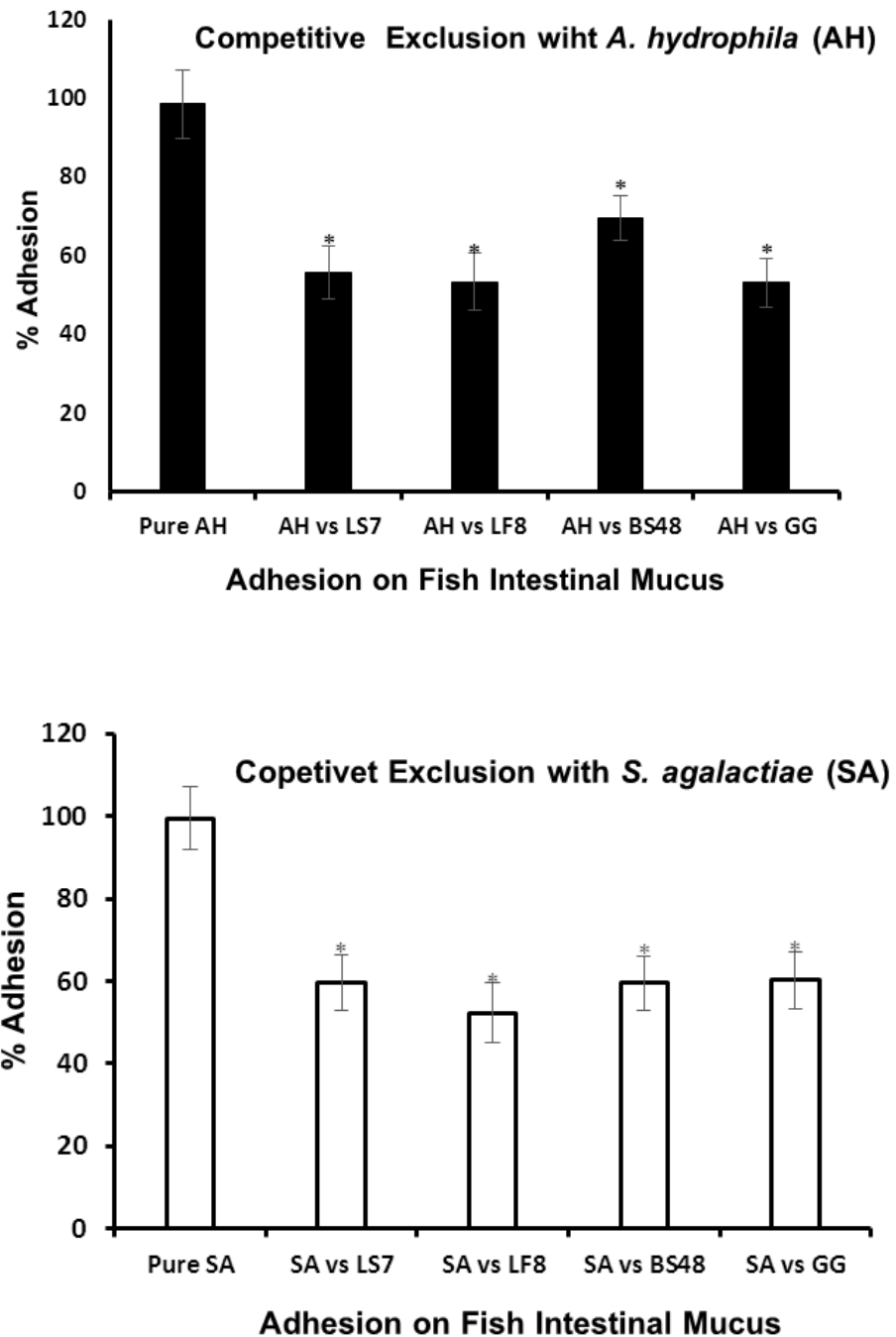
เพื่อยืนยันว่าเชื้อที่ศึกษาเกาะกับเมือกปลาแบบจำเพาะเจาะจงหรือไม่ ได้ทำการทดสอบการเกาะของเชื้อทั้ง 4 ตัวกับเมือกจากลำไส้ของปลา, bovine serum albumin (BSA), พื้นผิว polystyrene ดังแสดงในรูปที่ 3.7 พบว่าในขณะที่เชื้อที่แยกได้ทั้ง 3 ตัวเกาะกับเมือกจากลำไส้เล็กของปลาได้ดี แต่ไม่มีเชื้อตัวใดที่สามารถเกาะกับ BSA หรือ polystyrene ได้ ส่วนเชื้อ *L. rhamnosus* GG สามารถเกาะกับ BSA และ polystyrene ได้ ซึ่งตรงกับผลงานวิจัยของ Nikoskelainen และคณะ (2001) ที่ได้รายงานว่า *Bifidobacterium lactis* Bb12, *L. bulgaricus* และ *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 สามารถเกาะกับ BSA, polystyrene และ gelatin ได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นตัวชี้ให้เห็นว่าการเกาะของเชื้อทั้ง 3 ตัวกับเมือกปลาเป็นการเกาะที่จำเพาะเจาะจง และน่าจะมีการทำงานของสารบางอย่างที่เป็นตัวกลาง นักวิจัยหลายกลุ่มพบว่า มีสาร carbohydrate-specific molecules ที่ผิวของเซลล์ของเชื้อเป็นตัวจัดการให้เกิดการเกาะของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Mukai et al., 1992; Gusilsetal. 1999; Servin and Coconnier, 2003).



รูปที่ 3.7 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8, *Bacillus subtilis* BS48 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG กับเมือกจากลำไส้ของปลานิล bovine serum albumin และพื้นผิวที่เป็น polystyrene

7.4 การทดสอบความสามารถในการแย่งการยึดเกาะกับเมือกของปลากับเชื้อก่อโรคในปลา

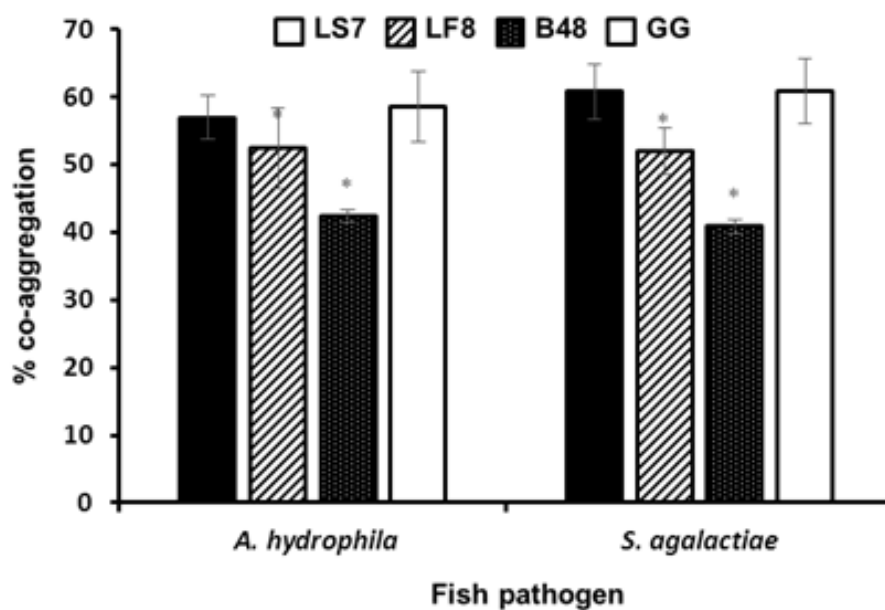
ในการทดสอบการแย่งจับกับเมือกของปลานั้น เมื่อให้เชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamnosus* GG เกาะที่เมือกจากลำไส้ของปลาก่อนแล้วใส่เชื้อก่อโรค *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ลงไปจับกับเมือกที่หลังเปรียบเทียบกับที่ไม่มีเชื้อเหล่านี้เกาะอยู่ก่อน พบว่า เชื้อที่เกาะอยู่ที่เมือกก่อนสามารถยับยั้งการเกาะด้วยกลไก competitive exclusion ได้ดี เมื่อพิจารณาผลการเกาะของเชื้อก่อโรคในรูปที่ 3.8 ทำให้ทราบว่า *A. hydrophila* เกาะกับเมือกปลาลดลงได้ 42.7, 45.1, 28.9 และ 45.2% เมื่อมีเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamnosus* GG เกาะอยู่ก่อน ตามลำดับ และสามารถลดการเกาะของเชื้อ *S. agalactiae* ได้ 39.7, 47.1, 39.9 และ 39.2% ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานอื่น ๆ ที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อโพรไบโอติกสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อก่อโรคได้ด้วยกลไกการแย่งจับกับ attachment site ทำให้เชื้อก่อโรคไม่สามารถสร้างโคโลนีและเจริญเติบโตได้ (Rinkinen et al., 2003; Chabrillón et al., 2005) มีรายงานว่าเชื้อโพรไบโอติกหลายชนิดรวมถึง *Lactobacillus* และ *Lactococcus* ที่สามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารได้ (Kimoto et al., 1999; Mukai et al., 2002; Gueimonde et al., 2006) กลไกอย่างหนึ่งคือการที่เชื้อโพรไบโอติกสร้างสารยับยั้งออกมา หรือกลไกของ steric hindrance หรือเกิดจากการแย่งจับกับ receptor ของเซลล์เป้าหมาย การศึกษาในครั้งนี้ พบว่า *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamnosus* GG ลดการเกาะของ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ต่อเมือกจากทางเดินอาหารของปลานิลได้สูงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



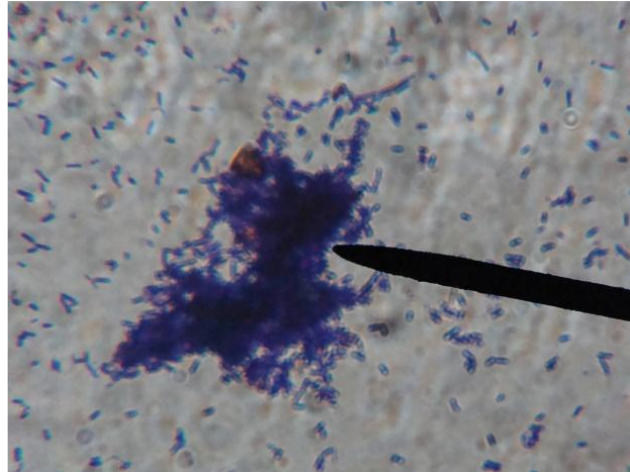
รูปที่ 3.8 ความสามารถในการยับยั้งการเกาะของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* (ก), และเชื้อ *Streptococcus agalactiae* (ข), ด้วยกลไก competitive exclusion ของ *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8, *Bacillus subtilis* BS48 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG บนเมือกจากลำไส้ของปลานิล, * = $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับ HA เดี่ยว ๆ หรือ SA เดี่ยว ๆ

8. ความสามารถในการเกาะกลุ่ม (co-aggregation) กับเชื้อก่อโรค

การเกาะกลุ่มกับเชื้อก่อโรคของเชื้อที่นำไปใช้เป็นโพรไบโอติกเป็นกลไกอย่างหนึ่งที่จะยับยั้งไม่ให้เชื้อก่อโรคไปเกาะกับเมือกหรือเซลล์ที่ทางเดินอาหารของปลาและที่ตัวปลาได้ จากรูปที่ 3.9 และ 3.10 พบว่าเชื้อ *L. pentosus* LS7 และ *L. rhamnosus* GG สามารถเกาะกลุ่มกับเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิดคือ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ได้ดี ใกล้เคียงกัน รองลงมาคือ *L. plantarum* LF8 และ *B. subtilis* BS48 ตามลำดับ ความสามารถในการเกิด co-aggregation ขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อโพรไบโอติกและเชื้อก่อโรค และขึ้นกับเวลาของการเกิดการเกาะกลุ่ม (Collado et al., 2008) และมีรายงานว่า การเกิดเกาะกลุ่มของ *Lactobacillus* spp. จะเป็นด่านป้องกันที่สำคัญในการเกาะตัวและสร้างโคโลนีของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร (Pelletier et al., 1997)



รูปที่ 3.9 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการเกิดการเกาะกลุ่มของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8, *Bacillus subtilis* BS48 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG กับเชื้อก่อโรคของปลา *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae*, * = $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับ LS7 และ GG



รูปที่ 3.10 การเกิดการเกาะกลุ่ม (co-aggregation) ของ *Lactobacillus pentosus* LS7 กับเชื้อก่อโรคในปลา *Aeromonas hydrophila*

9. การทดสอบความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์

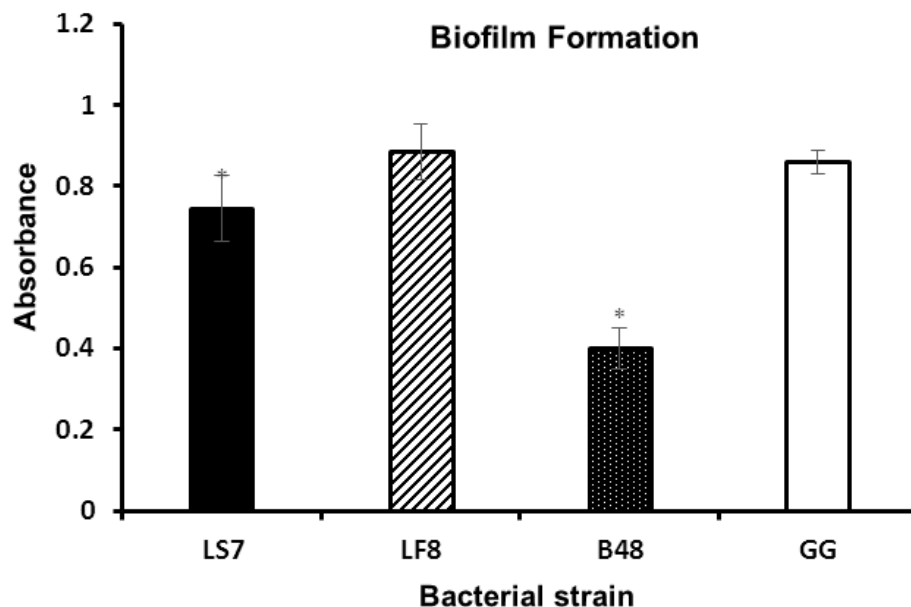
จากการนำเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* B48 และ *L. rhamnosus* GG มาทดสอบดูการรวมกลุ่มของเซลล์โดยผสมกับ ammonium sulfate ความเข้มข้นต่าง ๆ บนสไลด์แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า เชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* LF8 และ *B. subtilis* B48 รวมกลุ่มกันได้ดีที่ความเข้มข้นของ ammonium sulfate เท่ากับ 0.4, 0.4, 1.5 และ 2 โมล/ลิตร ตามลำดับ จากเกณฑ์ของค่า SAT value ดังแสดงในตารางที่ 3.9 จึงจัดว่า *L. pentosus* LS7 และ *L. rhamnosus* GG มีผิวเซลล์ที่ไม่ชอบน้ำมาก มีโอกาสรวมกลุ่มกันได้ดีสูง ส่วน *L. plantarum* LF8 มีความชอบน้ำปานกลางมีความสามารถที่จะรวมกลุ่มกันได้รองลงมา ส่วน *B. subtilis* B48 ผิวเซลล์ชอบน้ำจึงรวมกลุ่มกันได้ยาก การที่เชื้อโพรไบโอติกสามารถรวมกลุ่มกันได้ดี จะมีโอกาสเกาะกับเมือกหรือเซลล์ของปลาได้สูง ซึ่งจะช่วยป้องกันไม่ให้เกิดการเกาะของเชื้อก่อโรคได้

ตารางที่ 3.9 แสดงระดับความไม่ชอบน้ำของผิวเซลล์

เชื้อ	SAT value (Ammonium sulfate โมล/ลิตร) ที่ทำให้เซลล์รวมกลุ่มกัน	Surface hydrophobicity
<i>L. pentosus</i> LS7	0.4	High hydrophobicity
<i>L. plantarum</i> LF8	1.5	Intermediate hydrophobicity
<i>B. subtilis</i> BS48	2	Hydrophilic
<i>L. rhamnosus</i> GG	0.4	High hydrophobicity

10. ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์ม

จากรูปที่ 3.11 แสดงให้เห็นว่า *L. plantarum* LF8 มีความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มได้ดีที่สุดใกล้เคียงกับ *L. rhamonosus* GG รองลงมาคือ *L. pentosus* LS7 และ *B. subtilis* BS48 ซึ่งมีค่า OD ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ของ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamonosus* GG เท่ากับ 0.74, 0.88 และ 0.40 ตามลำดับ เชื้อที่มีค่า OD สูงแสดงว่ามีความสามารถในการเกิดไบโอฟิล์มได้ดี มีรายงานว่า *L. rhamonosus* GG สามารถสร้างไบโอฟิล์มบนพื้นผิวที่ไม่ใช่วัสดุชีวภาพได้ดี เช่น polystyrene โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะต่าง ๆ เช่น pH หรือการมีหรือไม่มีน้ำตาลและ mucin ร่วมด้วยจะมีอิทธิพลต่อการสร้างไบโอฟิล์มอย่างมาก (Salas-Jara, et al., 2016) การที่เชื้อสร้างไบโอฟิล์มได้ดีจะทำให้เชื้ออยู่กับลำไส้ปลาได้นานและสามารถแสดงคุณสมบัติที่ดีของการเป็นโพรไบโอติกได้ ช่วยป้องกันการเกาะของเชื้อก่อโรค ป้องกันการถูกทำลายด้วยยาปฏิชีวนะ (Lewis, 2001) และสามารถทำลายไบโอฟิล์มของเชื้อก่อโรคได้โดยการสร้างสารต่าง ๆ มาทำลายฟิล์ม เช่น bisosurfactant หรือสาร expolysaccharide (Kiran et al., 2015) หรือ bacteriocin จากการวิจัยพบว่ามียีนหลายตัวที่สร้างสารโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Lactobacillus* spp. (Marzorati et al., 2011)

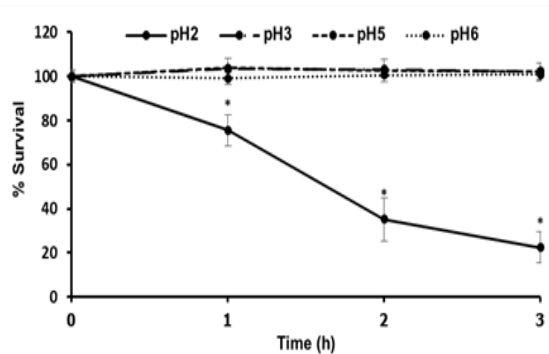


รูปที่ 3.11 ความสามารถในการสร้างไบโอฟิล์มของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8, *Bacillus subtilis* BS48 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG, เชื้อที่มีค่า OD สูงแสดงว่าสร้างไบโอฟิล์มได้ดี * = $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับ GG, * = $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับ LF8 และ GG (วัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร)

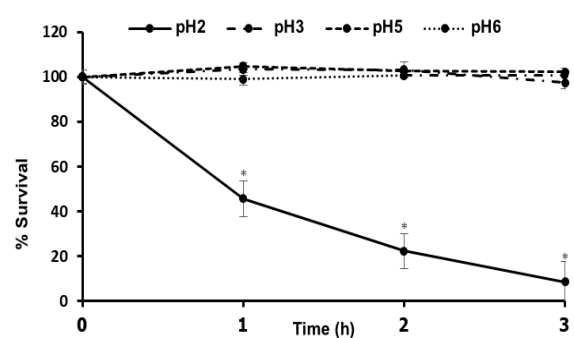
11. ความสามารถในการทนต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรงในทางเดินอาหารของปลา

11.1 ความสามารถในการทนต่อ pH 2, pH 3, pH 5 และ pH 6

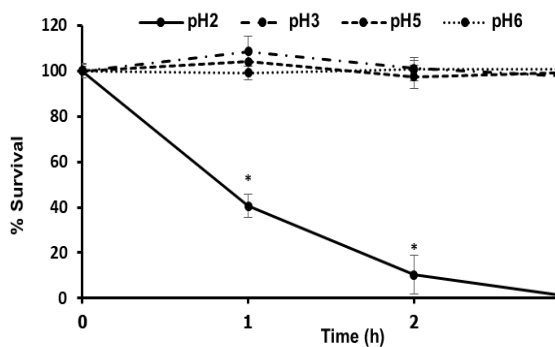
จากรูปที่ 3.12 แสดงให้เห็นว่า *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* B48 และ *L. rhamnosus* GG ทนต่อ pH ที่ต่ำได้ดี เชื้อทุกตัวมีชีวิตรอดได้ระดับหนึ่งที่ pH 2 เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชม. และเมื่อเวลาผ่านไปครบ 3 ชม. เชื้อทั้ง 4 ตัวมีชีวิตรอดได้ประมาณ 22, 8, 0 และ 12% ตามลำดับ พบว่า *B. subtilis* BS48 ทนต่อ pH 2 ได้น้อยกว่า *Lactobacillus* spp. ส่วนที่ pH 3, pH 5 และ pH 6 เชื้อทุกตัวมีชีวิตรอดได้ทั้งหมดตลอดเวลา 3 ชม. การทนกรดที่ pH ต่ำได้ เป็นคุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของโพรไบโอติกที่จะสามารถมีชีวิตรอดได้เมื่อผ่านกระเพาะอาหารของปลาที่มี pH ต่ำ



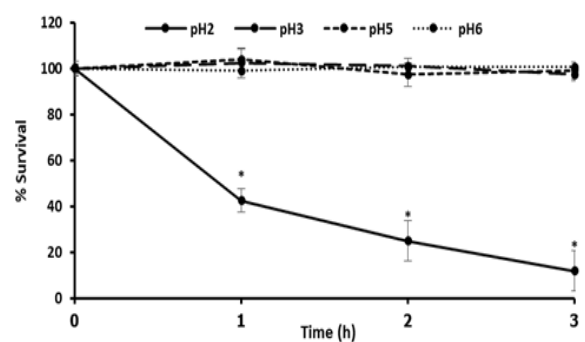
L. pentosus LS7



L. plantarum LF8



B. subtilis BS48

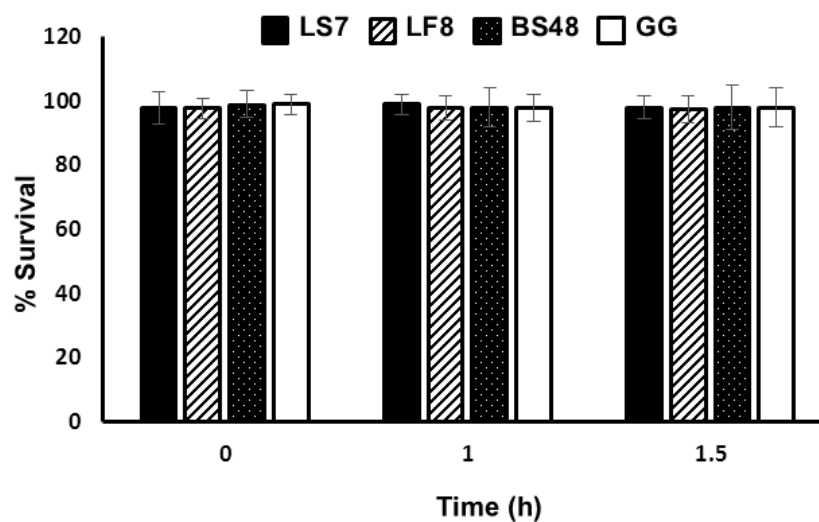


L. rhamnosus GG

รูปที่ 3.12 ความสามารถในการทนต่อ pH 2, pH 3, pH 5 และ pH 6 ของ *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8, *Bacillus subtilis* BS48 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG, * = $p < 0.05$ (เปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อเริ่มต้น)

11.2 ความสามารถในการทนต่อน้ำดีของปลา

ความสามารถในการทนต่อน้ำดีของปลาเป็นคุณสมบัติที่ดีของโพรไบโอติกที่จะมีโอกาสมีชีวิตอยู่ได้ในทางเดินอาหารของปลา แต่อย่างไรก็ตามยังมีความคิดเห็นที่ต่างกันว่าเชื้อควรจะทนต่อน้ำดีของปลาที่ความเข้มข้นเท่าไรจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *B. subtilis* BS48 สามารถทนต่อน้ำดี 10% (v/v) ของปลานิลได้ตลอดเวลา 1.5 ชม. จำนวนเชื้อไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเชื้อเริ่มต้น ดังแสดงในรูปที่ 3.13 เช่นเดียวกับกับการทดลองของ (Balcázar และคณะ (2008) ที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อโพรไบโอติกบางตัวทนต่อน้ำดีของปลาที่ความเข้มข้น 10% (v/v) ได้



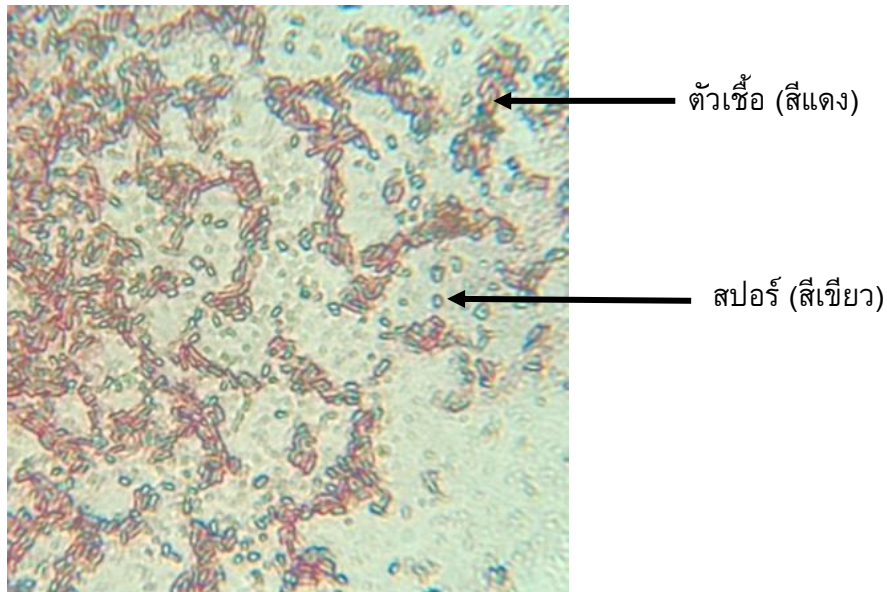
รูปที่ 3.13 ความสามารถในการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8, *Bacillus subtilis* BS48 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG ใน 10% (v/v) น้ำดีของปลานิล

12. การเตรียมเพลเลตอาหารปลาต้นแบบจากเชื้อ *Bacillus subtilis* BS48

เนื่องจากเชื้อ *B. subtilis* BS48 มีคุณสมบัติที่ดีน่าจะนำไปใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับปลาได้ และยังเป็นเชื้อที่สร้างสปอร์ได้ มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดีและสามารถทนต่อสภาวะที่ใช้ในการเตรียมเพลเลตได้ ในการเตรียมผลิตภัณฑ์ต้นแบบนี้ต้องการจะเตรียมเพลเลตที่เป็นอาหารปลาผสมด้วยเชื้อ *B. subtilis* BS48 ที่สามารถลอยน้ำได้นาน มีปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดอยู่ในตำรับได้สูง และมีความเป็นเพลเลตที่ดีคือมีความกร่อนต่ำคงรูปอยู่ได้นาน

ในการเตรียมเชื้อ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* BS48 ในสภาวะเร่งให้เชื้อสร้างสปอร์เป็นเวลา 5 วัน นำเชื้อมาย้อมสปอร์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์สปอร์ติดสีเขียวของ malachite green

ในขณะที่ตัวเชื้อติดสีแดงของ safranin แสดงให้เห็นว่า เชื้อ *B. subtilis* สามารถสร้างสปอร์ได้จำนวนมาก ดังแสดงในรูปที่ 3.14



รูปที่ 3.14 ตัวเชื้อ (vegetative cell) และสปอร์ของเชื้อ (endospore) ของ *Bacillus subtilis* BS48 จาก กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10X100 เท่า

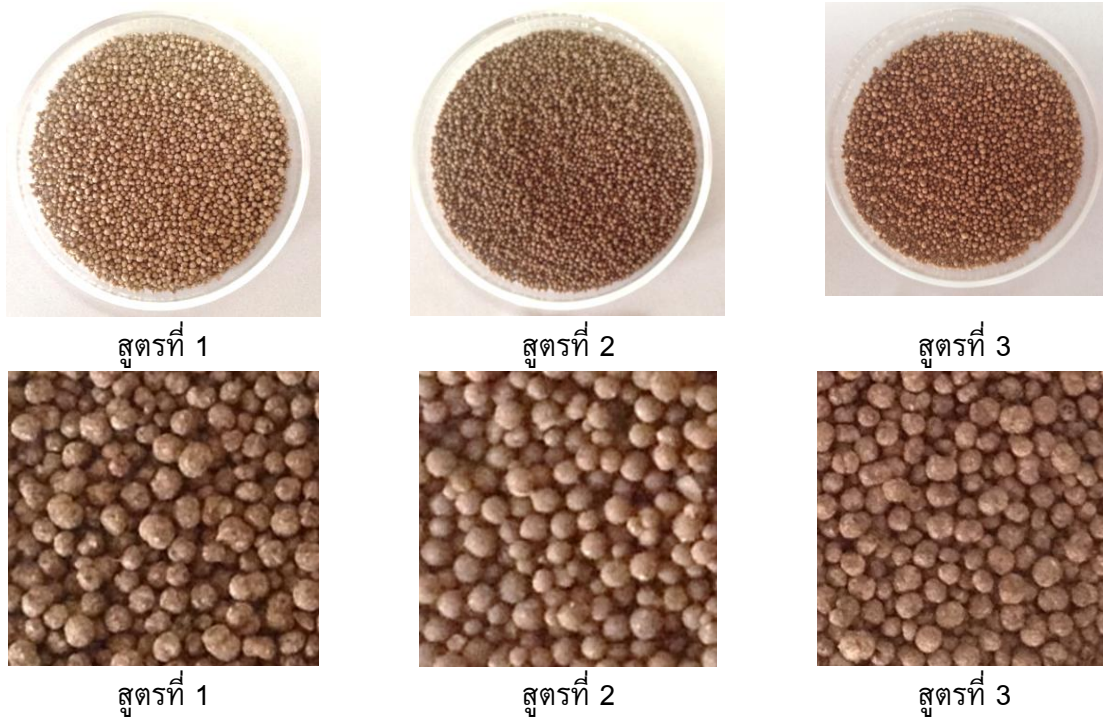
หลังทำ heat shock ในอ่างควบคุมอุณหภูมิเพื่อทำลายตัวเชื้อให้เหลือแต่สปอร์นำสปอร์มาเตรียมได้เป็น spore suspension ดังรูปที่ 3.15 เมื่อทำการตรวจนับสปอร์โดยวิธี spread plate พบว่า spore suspension มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 9.6×10^8 cfu/ml. ซึ่งมีปริมาณสปอร์เพียงพอที่จะนำไปใช้ในการเตรียมเพลลเลต



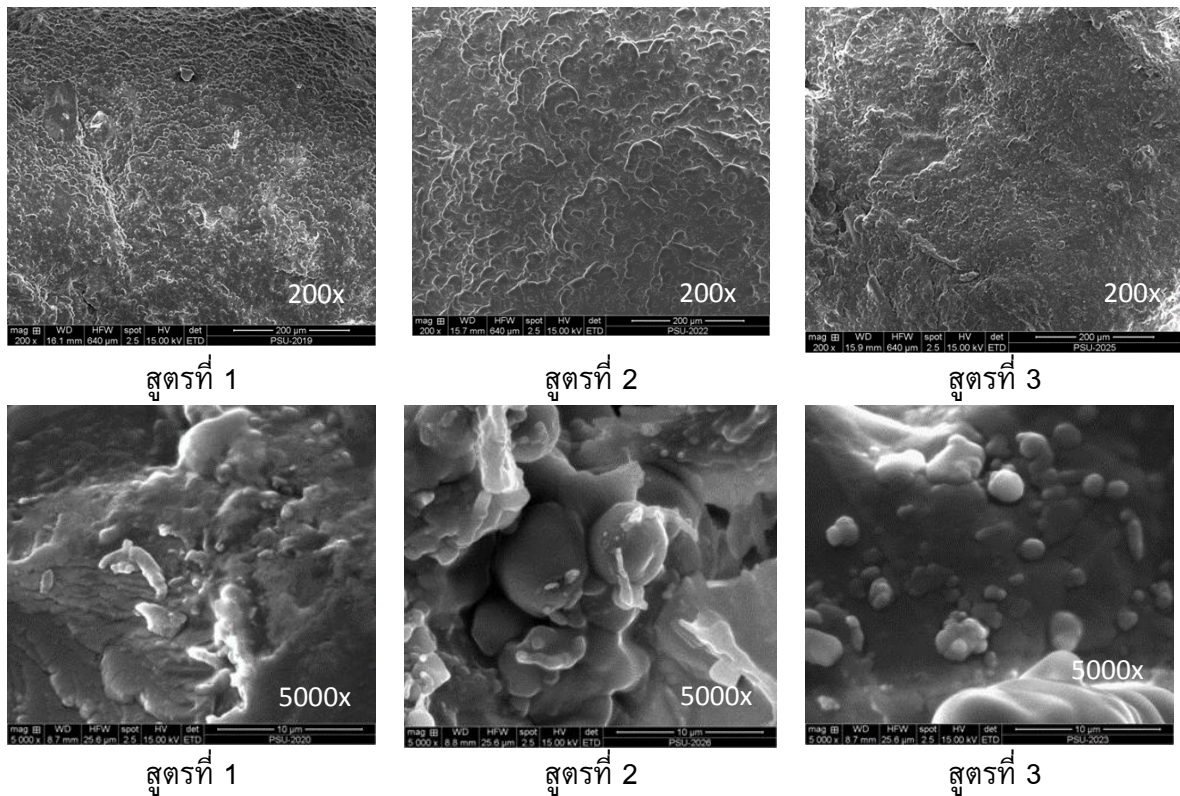
รูปที่ 3.15 สปอร์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* BS48 ในน้ำเกลือ

ผลการเตรียมเพลเลตด้วยวิธี extrusion – spheronization

เพลเลตมีส่วนประกอบหลักในตำรับ ได้แก่ ปลาป่น แแบ่งสาลี รำละเอียด น้ำมันพืช ฟรีมิกซ์ และ Avicel PH101TM ทั้ง 3 สูตรตำรับมีส่วนประกอบหลักในปริมาณเท่ากัน แต่มีความแตกต่างกันในส่วนผสมที่ช่วยในเรื่องความสามารถในการลอยน้ำของเพลเลต โดยสูตรตำรับที่ 1 ใส่น้ำตาลและยีสต์เพิ่มเติมจากส่วนประกอบหลัก เพื่อให้ยีสต์หมักน้ำตาลให้กลายเป็น CO₂ ในระหว่างกระบวนการผลิต โดยใช้ผ้าปิดภาชนะที่บรรจุเพลเลตไว้เกิดการหมักเป็นเวลา 3 ชม. ก่อนนำเพลเลตไปอบแห้งก็จะทำให้เกิดรูพรุนขึ้นภายในเพลเลต สูตรตำรับที่ 2 ใส่น้ำมันพืชในปริมาณมากขึ้นเป็น 25 กรัม ซึ่งอาศัยความหนาแน่นของน้ำมันที่น้อยกว่าน้ำ เป็นตัวช่วยให้เพลเลตสามารถลอยน้ำได้ และสูตรตำรับที่ 3 มีเฉพาะส่วนประกอบหลักของตำรับ ไม่มีการเติมส่วนผสมที่ช่วยให้เพลเลตลอยตัว เพลเลตทั้ง 3 สูตรตำรับ มีลักษณะกลมสีน้ำตาล ดังแสดงในรูปที่ 3.16 เมื่อศึกษาลักษณะของเพลเลตภายใต้เครื่อง SEM พบว่า เพลเลตทั้ง 3 สูตรตำรับ มีลักษณะกลม พื้นผิวค่อนข้างขรุขระ มองไม่เห็นสปอร์ เนื่องจากถูกบดบังด้วยส่วนประกอบต่าง ๆ ในตำรับ ดังแสดงในรูปที่ 3.17 อย่างไรก็ตามเมื่อนำเพลเลตไปนับจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตรอดปรากฏว่ายังมีเชื้ออยู่ปริมาณสูงได้มาตรฐานคือมีเชื้อประมาณ 10⁸ cfu/กรัม



รูปที่ 3.16 ลักษณะของเพลเลตในแต่ละสูตรตำรับ (ต่างกำลังขยาย)



รูปที่ 3.17 ลักษณะพื้นผิวของเพลเล็ตภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ต่างกำลังขยาย)

ผลการศึกษสมบัติทางกายภาพของเพลเล็ต

ขนาด (size)

จากการประเมินขนาดของเพลเล็ตดังแสดงในตารางที่ 3.11 พบว่าเพลเล็ตมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.93 – 2.13 มม. โดยสูตรตำรับที่ 1 มีขนาดอนุภาคใหญ่ที่สุด ขนาดเฉลี่ย 2.13 ± 0.10 มม. เนื่องจากมีส่วนผสมของยีสต์ เมื่อเกิดกระบวนการหมักยีสต์จะได้ CO_2 ส่งผลให้มีรูพรุนเกิดขึ้นในเพลเล็ต และเพลเล็ตมีขนาดขยายใหญ่ขึ้นกว่าสูตรตำรับอื่นๆ เล็กน้อย รองลงมาคือสูตรตำรับที่ 3 และ 2 ตามลำดับ โดยสูตรตำรับที่ 2 มีการเติมน้ำมันในปริมาณมากกว่าสูตรอื่น เนื้อ damp mass ที่ได้มีความนุ่ม เกิดการก่อตัวเป็นเพลเล็ตได้ง่าย

ความกร่อน (friability)

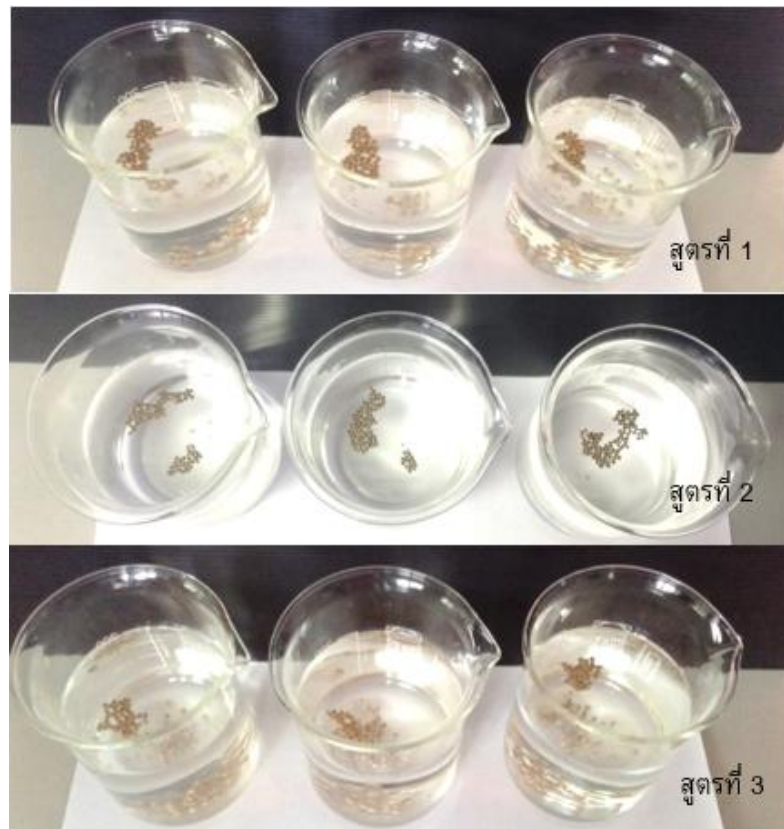
จากผลการประเมินความกร่อนของเพลเล็ต ดังแสดงในตารางที่ 3.11 โดยใช้เครื่อง friabilator พบว่า ทุกสูตรตำรับมีเปอร์เซ็นต์ความกร่อนน้อยกว่า 1% ซึ่งเป็นไปตามมาตรฐานเรื่องคุณสมบัติความกร่อนของเพลเล็ต

ความสามารถในการลอยน้ำ (floating ability)

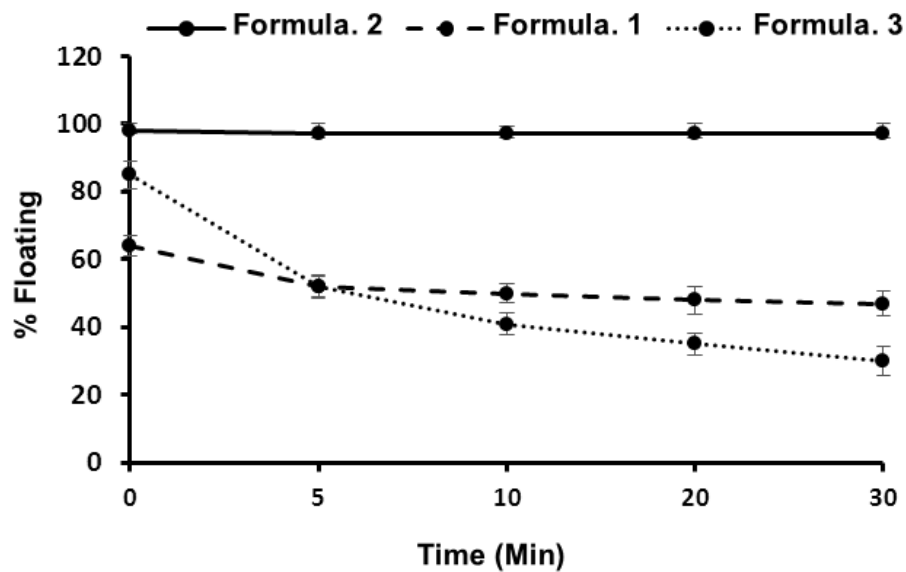
จากการประเมินความสามารถในการลอยน้ำเมื่อเวลาผ่านไป 1, 5, 10, 20, และ 30 นาที พบว่า สูตรตำรับที่ 2 มีความสามารถในการลอยน้ำมากที่สุด ซึ่งมีจำนวนเพลเลตที่ลอยน้ำเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาทีสูงถึง 98% ในขณะที่สูตรตำรับที่ 1 และ 3 มีจำนวนเพลเลตลอยน้ำเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาทีน้อยกว่า 50 % ดังแสดงในรูปที่ 3.18, 3.19 และตารางที่ 3.11 แสดงให้เห็นว่าการทำให้เพลเลตลอยน้ำโดยการใช้น้ำมันดีกว่าการใช้ยีสต์

ตารางที่ 3.10 สมบัติทางกายภาพของเพลเลต

สมบัติทางกายภาพ	สูตรตำรับที่		
	1	2	3
ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเพลเลต (มม.)	2.13 ± 0.10	1.93 ± 0.08	2.04 ± 0.07
% ความกร่อน	0.35 ± 0.03	0.72 ± 1.20	0.53 ± 0.28
% เพลเลตที่ลอยน้ำเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที	47 ± 5.86	98 ± 0.58	32 ± 9.07



รูปที่ 3.18 ความสามารถในการลอยน้ำของเพลเลตสูตรต่างๆ เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที



รูปที่ 3.19 ความสามารถในการลอยน้ำของเพลเลตที่เวลาต่าง ๆ

จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่รอดชีวิตในเพลเลต

จากการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียในเพลเลตโดยวิธี spread plate หลังผ่านกระบวนการผลิตเพลเลต ซึ่งผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 6 ชม. พบว่า ทั้ง 3 สูตร มีปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตในเพลเลตประมาณ 10^8 cfu/กรัม ซึ่งเป็นเป็นไปตามเป้าหมายที่กำหนดไว้คือ ประมาณ 10^7 /กรัม เนื่องจากเป็นปริมาณ ที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Newaj-Fyzul et al., 2013) อย่างไรก็ตามการมีปริมาณเชื้อที่มากกว่า 10^7 ก็ยังมีผลดีเพราะสัตว์น้ำจะได้รับเชื้อในปริมาณที่มากเพียงพอ โดยสูตรที่ 1, 2 และ 3 มีเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 3.1×10^8 cfu/กรัม, 4.1×10^8 cfu/กรัม และ 4.8×10^8 cfu/กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3.12

การหาจำนวนเชื้อแบคทีเรียในเพลเลตเมื่ออยู่ในสภาวะกระเพาะอาหารจำลอง (simulated gastric condition)

จากการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียในเพลเลต เมื่อเพลเลตอยู่ภายใต้สภาวะกระเพาะอาหารจำลอง เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชม. สูตรที่ 1, 2 และ 3 มีเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 1.3×10^8 cfu/กรัม, 3.2×10^8 cfu/กรัม และ 1.5×10^8 cfu/กรัม ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชม. พบว่า สูตรที่ 1, 2 และ 3 มีเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 1.3×10^8 cfu/กรัม, 3.1×10^8 cfu/กรัม และ 1.4×10^8 cfu/กรัม ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* ในเพลเลต สามารถทนต่อสภาวะกรดในกระเพาะอาหารจำลอง เนื่องจากเมื่อเพลเลตอยู่ในสภาวะเป็นกรดเป็นเวลา 1 และ 3 ชม. ดังผลที่แสดงในตารางที่ 3.11 ทั้ง 3 สูตรดำรงมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่รอดชีวิตในเพลเลตสูง คาดว่าส่วนประกอบในตำรับของเพลเลตจะช่วยป้องกันเชื้อไม่ให้ถูกทำลายด้วยกรดด้วยส่วนหนึ่ง ดังผลที่แสดงในตารางที่ 3.11

ตารางที่ 3.11 จำนวนสปอร์ของ *Bacillus subtilis* BS48 ที่อยู่รอดในเพลเลตในสภาวะน้ำย่อยใน
กระเพาะอาหารจำลอง

สภาวะที่ทดสอบ	จำนวนสปอร์ (cfu/กรัม) ในสูตรที่		
	1	2	3
หลังผ่านกระบวนการผลิต	3.1×10^8	4.1×10^8	4.8×10^8
เมื่อเพลเลตอยู่ในสภาวะกระเพาะอาหาร จำลอง เป็นเวลา 1 ชม.	2.3×10^8	3.2×10^8	1.5×10^8
เมื่อเพลเลตอยู่ในสภาวะกระเพาะอาหาร จำลอง เป็นเวลา 3 ชม.	2.3×10^8	3.1×10^8	1.4×10^8

จากการเตรียมเพลเลตที่บรรจุสปอร์ของเชื้อ *B. subtilis* BS48 3 สูตรตำรับ เมื่อทำการประเมินสมบัติทางกายภาพของเพลเลตพบว่า ทั้ง 3 สูตรมีความกร่อนได้มาตรฐาน มีเชื้อที่มีชีวิตรอดอยู่ในเพลเลตประมาณ 10^8 cfu/กรัม และทนทานต่อน้ำย่อยจำลองในกระเพาะอาหารได้นานกว่า 3 ชม. แต่สูตรที่ 2 สามารถล่อยน้ำได้นานที่สุด ซึ่งคิดว่าสูตรที่ 2 เป็นสูตรที่เหมาะสมที่จะนำไปศึกษาเพื่อเป็นการนำส่งโพรไบโอติกสำหรับใช้ป้องกันและรักษาโรคในปลาต่อไป

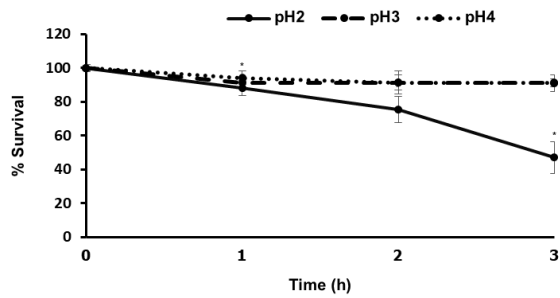
13. การศึกษาศักยภาพของเชื้อที่แยกได้สำหรับใช้เป็นโพรไบโอติกในคน

ในการศึกษาศักยภาพของเชื้อสำหรับใช้เป็นโพรไบโอติกในคนนั้น จะศึกษาเพื่อนำไปใช้ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในทางเดินอาหารและในช่องคลอด โดยศึกษาความสามารถในการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหารจำลอง การทนต่อน้ำดี การทนต่อน้ำย่อยในลำไส้เล็กจำลอง การทนต่อน้ำในช่องคลอดจำลอง ความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ลำไส้ของคนคือ Caco-2 ความสามารถในการยึดเกาะกับเซลล์ในช่องคลอดของคนคือ HeLa cell และความสามารถในการแย่งกันยึดเกาะกับเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารและเชื้อก่อโรคในช่องคลอด

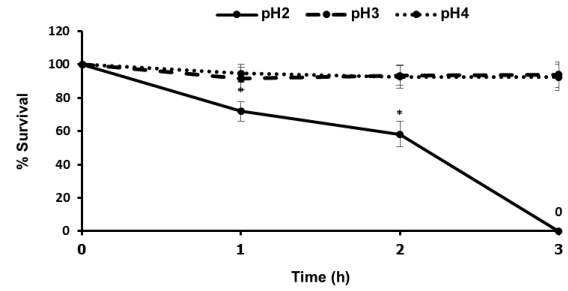
13.1 ความสามารถทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหารจำลอง

เมื่อนำ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamnosus* GG มาใส่ในน้ำย่อยในกระเพาะอาหารจำลองที่ pH 2, pH 3 และ pH 4 โดยมีเอนไซม์ pepsin ร่วมด้วย แล้วดูการมีชีวิตรอดที่เวลา 1-3 ชม. จากรูปที่ 3.20 พบว่าที่ pH 2 เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชม. ปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้น และเมื่อเวลาผ่านไปครบ 3 ชม. *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamnosus* GG มีชีวิตรอดอยู่ประมาณ 47, 0, 0 และ 47% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า *L. pentosus* LS7 และ *L. rhamnosus* GG สามารถทนต่อ

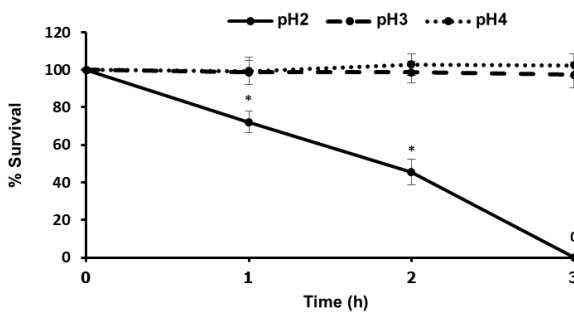
pH 2 ได้ใกล้เคียงกัน สำหรับที่ pH 3 และ pH 4 เชื่อว่าทุกตัวมีชีวิตรอดอยู่ได้ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตใกล้เคียงกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชม.



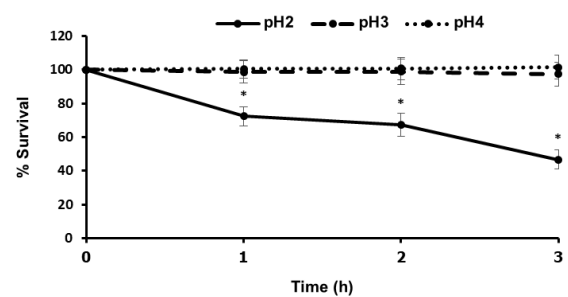
L. pentosus LS7



L. plantarum LF8



B. subtilis BS48



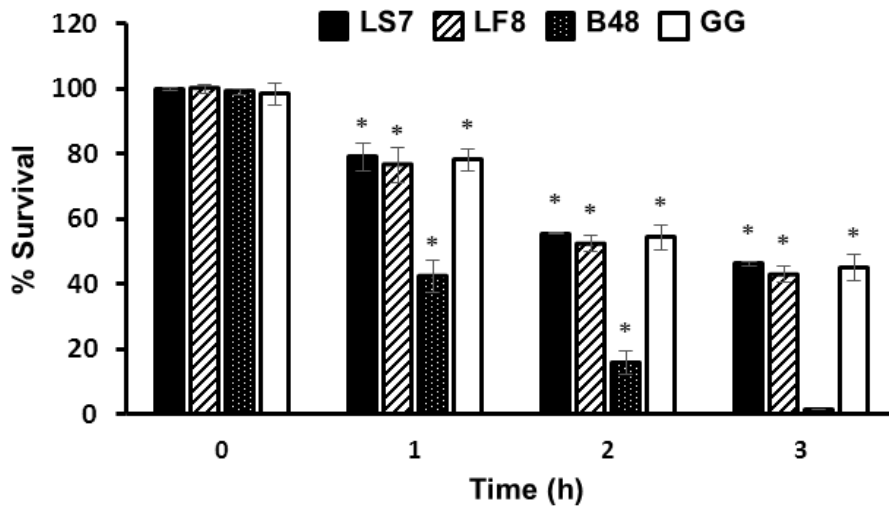
L. rhamnosus GG

รูปที่ 3.20 ความสามารถในการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหารจำลอง pH 2, pH 3 และ pH 4 ของ *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8, *Bacillus subtilis* BS48 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG, * = $p < 0.05$ (เปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อเริ่มต้น)

13.2 ความสามารถในการทนต่อน้ำดี (bile salt)

จากรูปที่ 3.21 พบว่า *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamnosus* GG ที่อยู่ใน 0.3% (w/v) oxgall เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชม. เชื่อว่าทุกตัวมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้น และลดลงเรื่อย ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 3 โดย *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamnosus* GG จะมีชีวิตรอดอยู่ ประมาณ 46, 43, 0 และ 45% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า *Lactobacillus* spp. ทนต่อน้ำดีได้นานกว่า 3 ชม. ขณะที่ *B. subtilis*

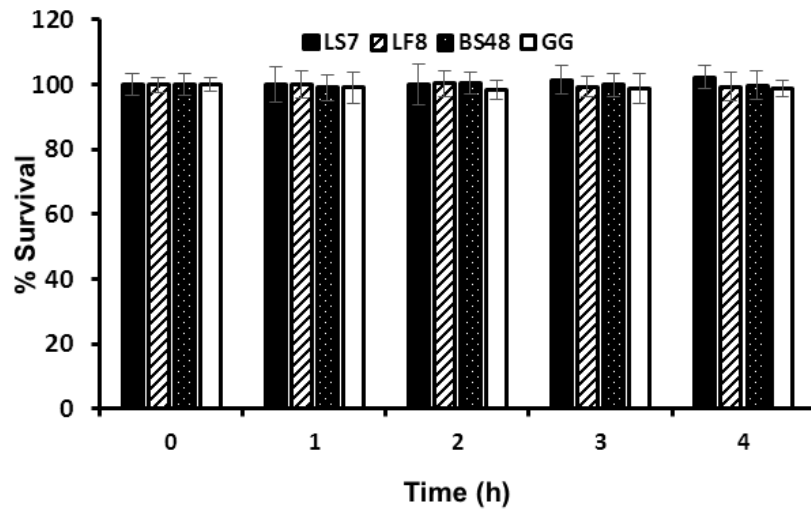
BS48 ทนได้ประมาณ 2 ชม. ในขณะที่ Thirabunyanan และ Thongwittaya (2012) รายงานว่าเชื้อ *B. subtilis* ทนต่อน้ำดี 0.3% (w/v) ได้นานกว่า 3 ชม. ทั้งนี้คาดว่าผลที่ต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ



รูปที่ 3.21 ความสามารถในการมีชีวิตรอดในน้ำดี (0.3% (w/v) oxgall) ของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8, *Bacillus subtilis* BS48 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG, * = $p < 0.05$ (เปรียบเทียบกัจำนวนเชื้อเริ่มต้น)

13.3 ความสามารถในการทนต่อน้ำย่อยในลำไส้จำลอง

จากการทดสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamnosus* GG มาใส่ในน้ำย่อยในกระเพาะอาหารจำลองที่ pH 6.8 ที่มีเอนไซม์ pancreatin จากรูปที่ 3.22 พบว่าเชื้อทุกตัวมีชีวิตรอดได้ดี ปริมาณเชื้อไม่ลดลงตลอดเวลา 4 ชม. ที่ทำการทดลอง และเอนไซม์ pancreatin ก็ไม่มีผลต่อเชื้อ

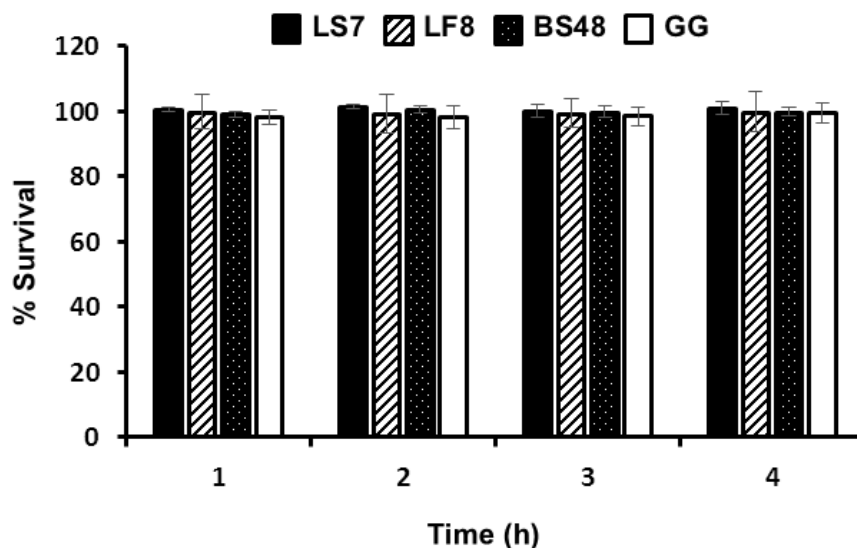


รูปที่ 3.22 ความสามารถในการมีชีวิตรอดในน้ำย่อยจำลองของลำไส้ของคน pH 6.8 ของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8, *Bacillus subtilis* BS48 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG

คุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของโพรไบโอติกที่จะใช้กับทางเดินอาหารของคนคือจะต้องทนต่อสภาวะรุนแรงในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้นได้ (Morelli, 2007) เป็นที่ทราบกันว่า pH ที่ต่ำและเอนไซม์ย่อยโปรตีน pepsin จะเป็นสิ่งขัดขวางที่สำคัญไม่ให้เชื้อแบคทีเรียแปลกปลอมมีชีวิตอยู่ได้ในทางเดินอาหาร ปกติ pH ของกระเพาะอาหารอาจต่ำได้ถึง 1.5 และอาจสูงได้ถึง 6 หลังจากรับประทานอาหาร แต่โดยทั่วไป pH จะอยู่ในช่วง 2.5-3.5 (Holzapfel et al., 1998) เชื้อ *L. pentosus* LS7 สามารถทน pH 2 ได้นานกว่า 3 ชม. ส่วนเชื้อ *L. plantarum* LF8 และ *B. subtilis* BS48 ทนต่อ pH 2 ได้ไม่เกิน 3 ชม. แต่เชื้อทุกตัวทนต่อ pH 3 และ pH 4 ได้ จึงคาดว่าเชื้อเหล่านี้ถ้านำไปใช้เป็นโพรไบโอติกในคนจะมีชีวิตรอดไปถึงลำไส้เล็กได้ดี สำหรับน้ำดีจะเป็นอันตรายกับเซลล์ของแบคทีเรีย เนื่องจากทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง ความสามารถในการทนต่อน้ำดีจึงเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่จะบอกได้ว่าเชื้อสามารถมีชีวิตรอดอยู่ในลำไส้เล็กได้ (Succi et al., 2005) นอกจากนี้เชื้อที่เป็นโพรไบโอติกควรจะทนต่อเอนไซม์ pancreatin ซึ่งเชื้อที่คัดเลือกมาทั้ง 3 ตัว สามารถทนต่อเอนไซม์ pancreatin ได้ อย่างไรก็ตามคุณสมบัติแต่ละอย่างก็จะขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อที่ทดสอบ จากผลการทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะน้ำย่อยในกระเพาะอาหารจำลอง ความสามารถในการทนต่อน้ำดี และความสามารถในการทนต่อน้ำย่อยในลำไส้เล็กจำลองของเชื้อ *Lactobacillus* spp. สอดคล้องกับการทดลองอื่น ๆ ที่มีผู้เคยศึกษามาก่อน (Turchi et al., 2013; Ryu and Chang, 2013; Yu et al., 2013)

13.4 ความสามารถในการทนน้ำในช่องคลอดจำลองของคน

จากการศึกษาความสามารถในการทนต่อหน้าในช่องคลอดจำลองของ จากรูปที่ 3.23 พบว่า เชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamnosus* GG มีชีวิตได้ 98-99% ตลอดเวลา 4 ชม. ของการทดสอบ ตามปกติช่องคลอดของคนจะมี pH ประมาณ 4-4.5 เนื่องจากมี lactic acid bacteria เป็นเชื้อประจำถิ่น โดยเฉพาะเชื้อ *Lactobacillus* spp. (Boris and Barbes, 2000) กรดที่เชื้อสร้างขึ้นจะช่วยยับยั้งและทำลายเชื้อก่อโรคที่จะเข้าไปในช่องคลอดซึ่งเป็นกลไกในการป้องกันเชื้อก่อโรคในช่องคลอดที่สำคัญอย่างหนึ่ง การที่เชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8 และ เชื้อ *B. subtilis* BS48 ทนต่อ pH 4.4 ได้ ก็จะมีโอกาสรอดชีวิตอยู่ในช่องคลอดได้นาน



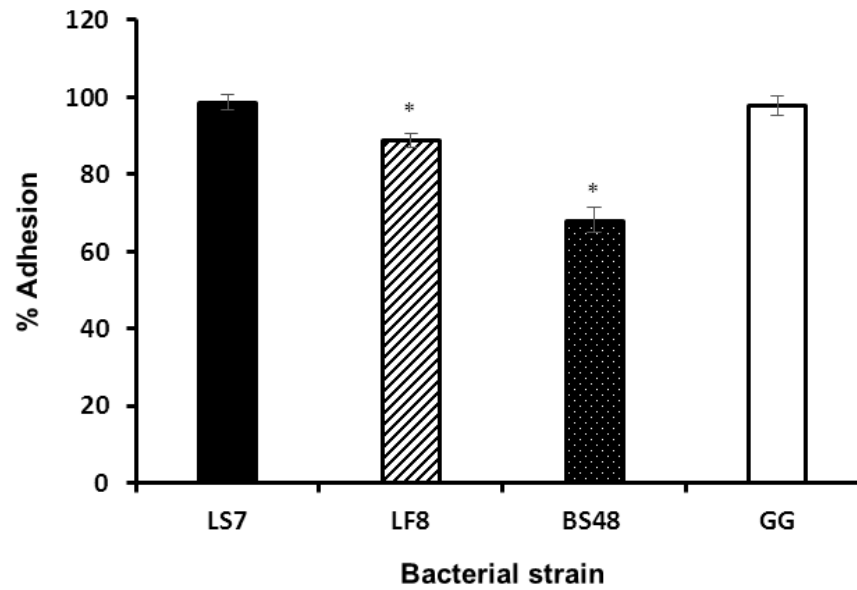
รูปที่ 3.23 ความสามารถในการมีชีวิตรอดในน้ำในช่องคลอดจำลองของคน ของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8, *Bacillus subtilis* BS48 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG

13.5 ความสามารถในการยึดเกาะกับ Caco-2 cell และ HeLa cell

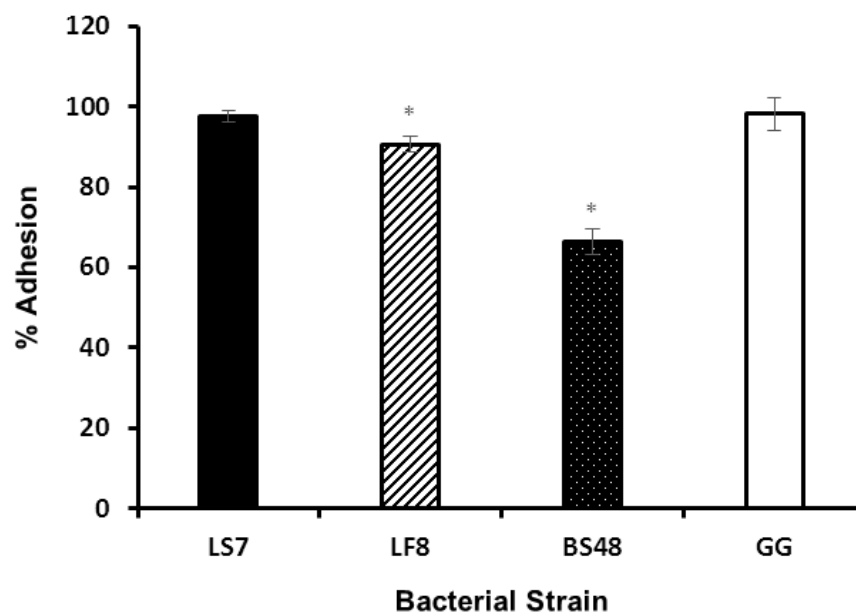
ความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 เปรียบเทียบกับโพรไบโอติกของคนคือ *L. rhamnosus* GG ต่อเซลล์ Caco-2 และ HeLa ดังแสดงในรูปที่ 3.24 และ 3.25 ตามลำดับ ความสามารถในการเกาะของ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamonusus* GG ต่อ Caco-2 cell เท่ากับ 98.63, 88.84, 68.14 และ 98.82% ตามลำดับ ความสามารถในการเกาะกับ HeLa เท่ากับ 97.6, 90.6, 66.36 และ 98.19.19% ตามลำดับ รูปที่ 3.26 แสดงการเกาะของ *L. pentosus* LS7 กับ Caco-2 ซึ่งแสดงให้เห็นการเกาะของเชื้อกับ

microvilli ของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (SEM) และรูปที่ 3.27 แสดงการเกาะของ *L. pentosus* LS7 กับ HeLa cell ภายใต้กล้อง inverted microscope

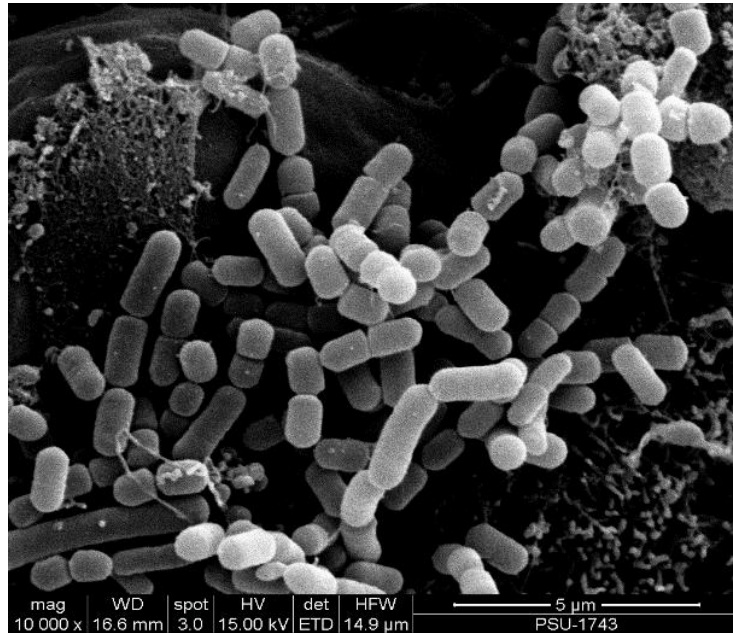
ความสามารถในการเกาะของเชื้อกับ epithelial cell เป็นเกณฑ์ที่สำคัญอย่างหนึ่งในการคัดเลือกเชื้อโพรไบโอติก เชื้อที่สามารถเกาะกับเซลล์ได้ดีก็จะมีชีวิตอยู่ในเจ้าบ้านได้นานและสามารถแสดงคุณสมบัติของความเป็นโพรไบโอติกในเรื่องต่าง ๆ ได้ แต่การศึกษาการเกาะของเชื้อภายในร่างกายคน (*In Vivo*) หรือสัตว์เป็นสิ่งที่ทำได้ยากจึงต้องมีการพัฒนาวิธีการยัดเกาะนอกร่างกาย (*In Vitro*) (Blum et al., 1990) ในการทดลองในครั้งนี้ Caco-2 cell เป็นเซลล์ของคนซึ่งเป็น colon carcinomas แต่มีลักษณะทาง phenotypes ที่แสดงออกเหมือนกับเซลล์ที่ intestinal mucosa ที่ชื่อว่า enterocyte และ goblet cells และมีการ differentiate เหมือน enterocyte คือมี microvilli และ enzyme เหมือนกับ enterocyte แต่ไม่สร้าง mucus จึงจัดเป็น non-mucus secreting small intestine-type enterocytes (Lewandowska et al., 2005) ส่วน HeLa cell จะเป็น cervical carcinoma ของคนจึงใช้เป็นตัวแทนของ vaginal epithelia cell เชื้อ *Lactobacillus* spp. ทั้ง 3 สายพันธุ์และ *B. subtilis* BS48 สามารถยัดเกาะได้ทั้ง 2 เซลล์ โดย *L. pentosus* LS7 จะยัดเกาะได้ดีเทียบเท่ากับ *L. rhamnosus* GG และยัดเกาะได้ดีกว่า *L. plantarum* LF8 และ *B. subtilis* BS48 อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่า *L. pentosus* LS7 มีโอกาสที่จะเจริญในลำไส้เล็ก และช่องคลอดของคนได้ดีกว่าเชื้ออีก 2 ตัว นอกจากนี้ยังมีการใช้ HeLa cell เป็นแบบในการศึกษาการยัดเกาะจากหลายงานวิจัย (Atassi et al., 2006, Martin et al., 2012, Tropcheva et al., 2011) จากการศึกษาของ Tropcheva และคณะ (2011) ได้ทดลองความสามารถในการเกาะของ *L. plantarum* AC131 กับ HeLa cell พบว่า สายพันธุ์ AC131 สามารถยัดเกาะกับ HeLa cell ได้ดีมาก อย่างไรก็ตาม *L. plantarum* LF8 มีความสามารถในการเกาะกับ Caco-2 cell และ HeLa cell ได้สูง ส่วน *B. subtilis* BS48 มีความสามารถในการเกาะกับเซลล์ทั้ง 2 ชนิดได้ในปริมาณที่ต่ำกว่า



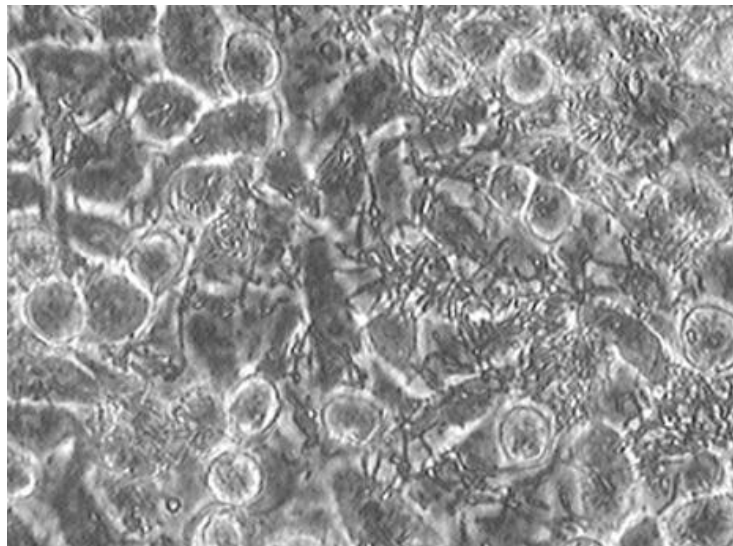
รูปที่ 3.24 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8, *Bacillus subtilis* BS48 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG กับ Caco-2 cell, * = $p < 0.05$ (เปรียบเทียบด้วย LS7 และ GG)



รูปที่ 3.25 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความสามารถในการยึดเกาะของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8, *Bacillus subtilis* BS48 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG กับ HeLa cell * = $p < 0.05$ (เปรียบเทียบด้วย LS7 และ GG)



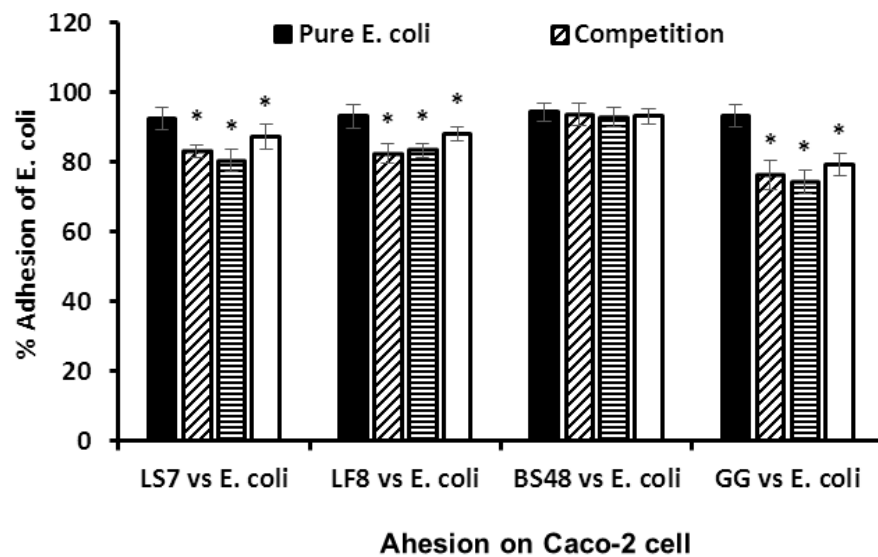
รูปที่ 3.26 การยึดเกาะของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* LS7 กับ Caco-2 cell (ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน, SEM)



รูปที่ 3.27 การยึดเกาะของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* LS7 กับ HeLa cell (ภาพจากกล้อง inverted microscope)

13.6. ความสามารถในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารและช่องคลอด

การยับยั้งการเกาะของ *E.coli*: *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamnosus* GG แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีเชื้อเหล่านี้สามารถยับยั้งการเกาะของ *E. coli* บน Caco-2 cell ได้ ดังแสดงในรูปที่ 3.28 และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งดังต่อไปนี้



รูปที่ 3.28 การยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ *Escherichia coli* ของ *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8, *Bacillus subtilis* BS48 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG กับ Caco-2 cell, * = $p < 0.05$ (เปรียบเทียบกับการยึดเกาะของ *E. coli* เดี่ยว ๆ)

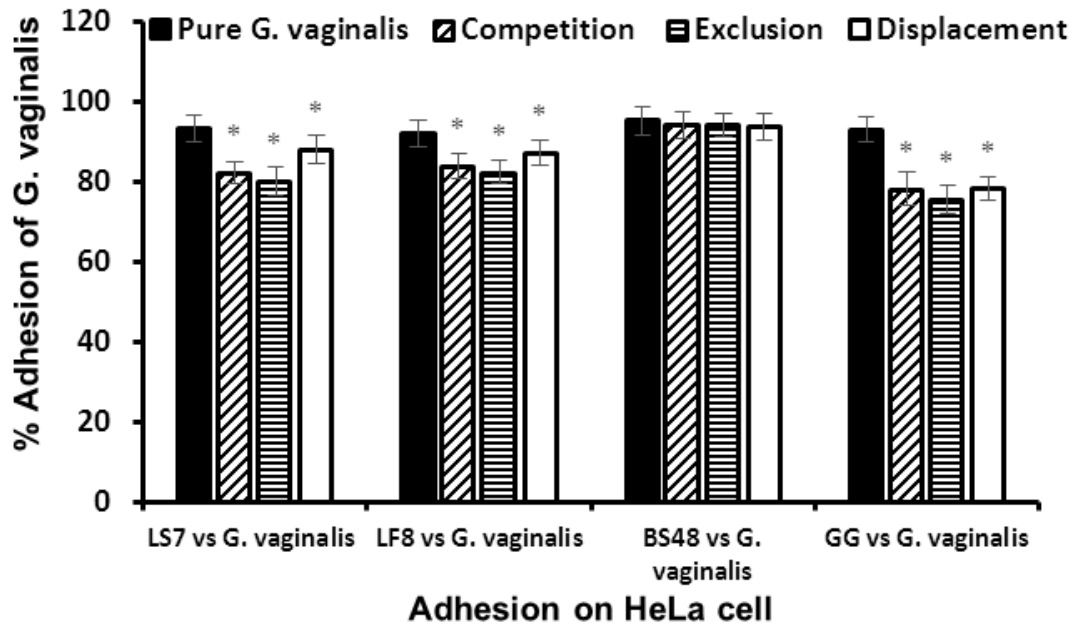
L. pentosus LS7 ยับยั้งการเกาะแบบ competition, exclusion และ displacement ได้เท่ากับ 10.2, 12.1 และ 5.2% ตามลำดับ

L. plantarum LF8 ยับยั้งการเกาะแบบ competition, exclusion และ displacement ได้เท่ากับ 10.8, 9.0 และ 5.1% ตามลำดับ

B. subtilis BS48 ยับยั้งการเกาะแบบ competition, exclusion และ displacement ได้เท่ากับ 0.7, 1.5 และ 1.1% ตามลำดับ

L. rhamnosus GG ยับยั้งการเกาะแบบ competition, exclusion and displacement ได้เท่ากับ 17, 19 และ 13.9 % ตามลำดับ

การยับยั้งการเกาะของ *G. vaginalis*: *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8, *B. subtilis* BS48 และ *L. rhamnosus* GG แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีเชื้อเหล่านี้สามารถยับยั้งการเกาะของ *G. vaginalis* บน HeLa cell ได้ ดังแสดงในรูปที่ 3.29 และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งดังต่อไปนี้



รูปที่ 3.29 การยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ *Gardnerella vaginalis* ของ *Lactobacillus pentosus* LS7, *Lactobacillus plantarum* LF8, *Bacillus subtilis* BS48 และ *Lactobacillus rhamnosus* GG กับ HeLa cell , * = $p < 0.05$ (เปรียบเทียบกับการยึดเกาะของ *G. vaginalis* เดี่ยว ๆ)

L. pentosus LS7 ยับยั้งการเกาะแบบ competition, exclusion และ displacement ได้เท่ากับ 11, 13.1 และ 5.2% ตามลำดับ

L. plantarum LF8 ยับยั้งการเกาะแบบ competition, exclusion and displacement ได้เท่ากับ 8.1, 9.8 และ 4.3% ตามลำดับ

B. subtilis BS48 ยับยั้งการเกาะแบบ competition, exclusion และ displacement ได้เท่ากับ 1.1, 1.2 และ 1.5% ตามลำดับ

L. rhamnosus GG ยับยั้งการเกาะแบบ competition, exclusion และ displacement ได้เท่ากับ 17.9, 17.6 และ 14.8 % ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่า *Lactobacillus* spp. ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถยับยั้งการเกาะของเชื้อก่อโรคของทางเดินอาหารและเชื้อก่อโรคในช่องคลอดได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ การเกาะของเชื้อก่อโรคที่ไม่มีเชื้อ *Lactobacillus* spp. เข้าไปเกี่ยวข้อง เชื้อที่ยับยั้งการเกาะได้ดีที่สุดโดยรวมคือ *L. rhamnosus* GG รองลงมาคือ *L. pentosus* LS7 และ *L. plantarum* LF8 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *B. subtilis* BS48 ยับยั้งการเกาะของเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ตัวได้น้อย ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับการเกาะของเชื้อก่อโรคที่ไม่มี *B. subtilis* BS48 เข้าไปเกี่ยวข้อง

กลไกในการป้องกันการเกาะของเชื้อก่อโรคนิวเซลล์อาจจะเกิดจาก การเกิด non-specific hindrance ของ receptor กับเชื้อก่อโรค หรือเกิดจากการที่เชื้อโพรไบโอติกไปแย่งเชื้อก่อโรคจับกับ binding site (Matijasic et al., 2006) ซึ่งการยับยั้งการเกาะที่เกิดขึ้นนี้จะเจาะจงกับเชื้อโพรไบโอติกและเชื้อก่อโรคแต่ละชนิด (Collado et al., 2005) Gueimonde และคณะ (2006) ได้รายงานว่าการยับยั้งการเกาะของเชื้อ enteropathogens โดยเชื้อ *Lactobacillus* spp. ต่าง ๆ จะมีความจำเพาะเจาะจงกันสูง ซึ่งจะชี้ให้เห็นว่าต้องมีการทดลองการยับยั้งการเกาะของเชื้อก่อโรคกับเชื้อ *Lactobacillus* ตัวต่อตัวจึงจะบอกว่าเชื้อ *Lactobacillus* sp. ตัวนั้นสามารถยับยั้งการเกาะของเชื้อก่อโรคตัวไหนได้ดี ความสามารถในการยับยั้งการเกาะของเชื้อก่อโรคโดยเชื้อโพรไบโอติกด้วยกลไก competition, exclusion และ displacement ได้มีการศึกษากันหลากหลาย (Candela et al., 2008, Stober et al., 2010, Zhang et al., 2010) Lee และคณะ (2003) รายงานว่า *L. rhamnosus* GG และ *L. casei* Shirota สามารถเกิดการแย่งจับกับเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร แบบ competition, exclusion และ displacement ได้ แต่ระดับความสามารถในการยับยั้งการเกาะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อก่อโรค

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. การเก็บตัวอย่างดิน ตะกอนตม และตัวอย่างสัตว์น้ำจากป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส ได้ตัวอย่างดินและตะกอนตมทั้งหมด 50 ตัวอย่าง และตัวอย่างสัตว์น้ำ 100 ตัวอย่าง เมื่อนำมาแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* spp. ได้เชื้อ *Lactobacillus* spp. 150 isolate และได้เชื้อ *Bacillus* spp. 122 isolate
2. เมื่อนำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลาคือ *Aeromonas hydrophila* และ *Streptococcus agalactiae* และเชื้อก่อโรคในคน 7 ชนิดได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* และ *Gardnerella vaginalis* พบว่าเชื้อ *Lactobacillus* spp. มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคบางชนิดได้ 13 isolate และยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ทุกชนิด 2 isolate คือ *Lactobacillus* รหัส LS7 ที่แยกได้จากดิน และ รหัส LF8 ที่แยกได้จากปลา และ *Bacillus* ที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคได้บางชนิด 1 isolate และยับยั้งเชื้อทุกชนิด 1 isolate คือรหัส BS48 ที่แยกได้จากดิน
3. คัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* LS7, LF8 และ *Bacillus* BS48 ที่สามารถฆ่าเชื้อก่อโรคได้ทุกชนิดไปจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ โดยการทำให้ 16S rDNA sequencing แล้วเทียบนิวคลีโอไทด์กับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อที่มีอยู่ใน data base พบว่า LS7 เป็นเชื้อ *Lactobacillus pentosus*, LF8 เป็นเชื้อ *Lactobacillus plantarum* และ BS48 เป็นเชื้อ *Bacillus subtilis*
4. นำเชื้อ *L. pentosus* LS7, *L. plantum* LF8 และ *B. subtilis* BS48 มาศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการป้องกันหรือรักษาโรคติดเชื้อในปลาและสัตว์น้ำเทียบกับโพรไบโอติกที่สำคัญคือ *L. rhamnosus* GG พบว่าเชื้อ LS7, LF8 สร้างสารที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคหลายชนิด ได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซีติก H_2O_2 และ LF8 สร้างสารที่ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนซึ่งอาจจะเป็นสารในกลุ่มแบคเทอริโอซินอีกด้วย ส่วน BS48 สร้าง H_2O_2 และสารยับยั้งเชื้อที่ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน แต่ไม่สร้างกรดแลคติกหรือกรดอะซีติก เชื้อทั้ง 3 ตัวมีความสามารถในการเกาะกับเมือกในทางเดินอาหารและเมือกที่ติดตัวปลาของปลานิลได้ดี แต่ไม่สามารถแทรกตัวเข้าไปในเมือกปลาได้ สามารถยับยั้งการเกาะของเชื้อก่อโรคในปลาคือ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ด้วยกลไก competitive exclusion ได้ดี เชื้อ LS7 และ LF8 สามารถเกาะกลุ่มกับเชื้อทั้ง 2 ตัวได้ดีกว่า BS48 ซึ่งการเกาะกลุ่มกับเชื้อก่อโรคจะทำให้เชื้อก่อโรคเกาะกับเมือกหรือเซลล์ของตัวปลาไม่ได้ เชื้อ

LS7 และ LF8 สร้างไบโอฟิล์มได้ดี ซึ่งจะช่วยให้เกาะกับเมือกหรือเซลล์ของปลาได้ดีและจะช่วยยับยั้งการเกาะของเชื้อโรคได้อีกด้วย ส่วน BS48 สร้างไบโอฟิล์มได้น้อยกว่าเชื้ออื่น เชื้อทั้ง 3 ตัวทน pH 2 ได้ประมาณ 2-3 ชั่วโมง แต่ทน pH3, pH5 และ pH6 ได้นานกว่า 3 ชม. และทนต่อน้ำตาลของปลา 10% (v/v) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อจะมีโอกาสมีชีวิตรอดได้เมื่อผ่านกระเพาะอาหารที่เป็นกรดของปลาและมีชีวิตรอดในสภาวะที่มีน้ำตาลของลำไส้เล็กได้ ซึ่งในภาพรวมเชื้อ LS7, LF8 และ BS48 มีคุณสมบัติที่ดีใกล้เคียงกับ *L. rhamnosus* GG ซึ่งเชื้อทั้ง 3 ตัวมีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเป็นโพรไบโอติกสำหรับปลาหรือสัตว์น้ำอื่นได้

5. เนื่องจากเชื้อ BS48 เป็นเชื้อที่สร้างสปอร์ที่ทนทานต่อสิ่งแวดล้อม ทนทานต่อสภาพรุนแรงต่อกระบวนการผลิตได้ดีกว่า LS7 และ LF8 จึงได้นำเชื้อนี้มาเตรียมเพลเลตอาหารปลาลอยน้ำที่ใส่สปอร์ของเชื้อนี้ลงไปเพื่อให้ปลากินเปรียบเทียบกัน 3 สูตร พบว่าสูตรที่เตรียมได้ทุกสูตรมีเชื้อมากกว่า 10^8 cfu/กรัม และมีความกร่อนน้อยกว่า 1% เป็นไปตามเป้าหมายแต่สูตรที่ 2 สามารถลอยน้ำได้นานเกินกว่า 30 นาที ซึ่งดีกว่าอีก 2 สูตร โดยสูตรที่ 2 มีส่วนประกอบเป็นปลาป่น 52.5 กรัม แป้งสาลี 30 กรัม รำละเอียด 30 กรัม น้ำมันพืช 25 กรัม ฟอสฟอรัส (แร่ธาตุรวม) 0.15 กรัม Avicel PH101™ 10.5 กรัม BS48 สปอร์ 8.57×10^8 cfu/กรัม คาดว่าสูตรของเพลเลตนี้สามารถนำไปเป็นต้นแบบในการผลิตเพลเลตลอยน้ำเพื่อนำไปใช้ในภาคสนาม สำหรับเป็นตัวนำส่งโพรไบโอติกไปสู่ปลาหรือสัตว์น้ำได้
6. เมื่อนำเชื้อทั้ง 3 ตัวไปประเมินความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้เป็นโพรไบโอติกในคน พบว่าเชื้อ LS7 ทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหารจำลอง pH 2 ได้นานกว่า 3 ชม. ส่วน LF8, BS48 ทนได้ประมาณ 2 ชม. ทุกตัวทนต่อน้ำย่อยในลำไส้เล็กจำลองได้เกิน 4 ชม. LS7 และ LF8 ทนต่อน้ำดี 0.3% (w/v) ได้นานกว่า 3 ชม. แต่ BS48 ทนได้เพียง 2 ชม. เชื้อทุกตัวทนต่อน้ำตาลในช่องคลอดจำลองได้นานกว่า 4 ชม. เชื้อ LS7 และ LF8 สามารถยึดเกาะกับเซลล์ Caco-2 ซึ่งเป็นเซลล์ลำไส้ของคน และ HeLa ซึ่งเป็นเซลล์ในช่องคลอดของคนได้ดีกว่า BS48 อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเกาะของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารของคนคือ *E. coli* และเชื้อก่อโรคในช่องคลอดของคนคือ *G. vaginalis* พบว่าเชื้อทั้ง 3 ตัวสามารถยับยั้งการเกาะของเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิดได้ดี ซึ่งคุณสมบัติต่าง ๆ ของ LS7 และ LF8 ที่ทดสอบใกล้เคียงกับคุณสมบัติของเชื้อ *L. rhamnosus* GG จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ LS7 และ LF8 มีโอกาสที่จะมีชีวิตรอดเมื่อผ่านกระเพาะอาหารที่มีกรดสูงและลำไส้เล็กส่วนต้นที่มีเกลือน้ำดี และมีโอกาสที่จะไปเจริญที่ลำไส้และในช่องคลอดได้ สามารถยึดเกาะกับเซลล์ของลำไส้ได้ดี และยับยั้งการเกาะของ

เชื้อก่อโรคกับเซลล์ได้ดี ส่วน BS48 มีคุณสมบัติที่ด้อยกว่าซึ่งอาจจะไม่เหมาะในการนำไปใช้เป็น โพรไบโอติกของคน และเชื้อในกลุ่มนี้ก็ไม่เป็นที่นิยมนำมาใช้กับคน

7. จากผลการวิจัยสรุปได้ว่าในดิน ตะกอนตม และสัตว์น้ำ จากป่าพรุโต๊ะแดง มีเชื้อแลคติกแอซิด โดยเฉพาะเชื้อในจีนัส *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* spp. ที่เป็นประโยชน์สามารถนำมาศึกษา และพัฒนาเป็นโพรไบโอติกสำหรับป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อในสัตว์และในคนได้ และคาดว่าจะยังมีเชื้อที่เป็นประโยชน์ด้านอื่น ๆ อีกมาก จากเชื้อที่แยกได้ 3 ตัว คือ *L. pentosus* LS7, *L. plantarum* LF8 และ *B. subtilis* BS48 ทุกตัวมีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะใช้เป็นโพรไบโอติกในปลาหรือสัตว์น้ำอื่น ๆ และ *L. pentosus* LS7 และ *L. plantarum* LF8 เหมาะที่จะใช้เป็นโพรไบโอติกในคนได้ นอกเหนือจากคุณสมบัติที่ได้ศึกษาไปแล้วนี้ อาจจะศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกด้านอื่น ๆ ในอนาคต เช่น ความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์และในคน ความสามารถในการปรับปรุงสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงสัตว์น้ำให้ดีขึ้น เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การที่จะนำเชื้อโพรไบโอติกมาใช้ให้เกิดประโยชน์ได้จริงนั้น จะต้องมีการศึกษาในเรื่องต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องให้รอบด้าน เช่น ศึกษาถึงวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อให้มีปริมาณมากเพียงพอที่จะนำมาใช้ ศึกษาการตั้งสูตรตำรับอาหารเพื่อให้เชื้อมีชีวิตรอดในอาหารให้มากและยาวนานที่สุด ศึกษาวิธีการนำส่งเชื้อโพรไบโอติกให้ไปถึงเป้าหมายอย่างมีประสิทธิภาพ ศึกษาประสิทธิผลในการป้องกันและรักษาโรคในภาคสนาม ศึกษาผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และเมื่อต้องการนำเชื้อโพรไบโอติกมาใช้ในคนจะต้องคำนึงถึงความปลอดภัย และประสิทธิผลของการป้องกันและรักษาโรค โดยมีข้อมูลทางคลินิกมาสนับสนุน

บทที่ 5

เอกสารอ้างอิง

- นิลกุล กิจอันเจริญ ชุติมา หาญจวณิช นงนุช สุวรรณเพ็ง. 2549. ประสิทธิภาพของการให้วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสในปลานิล. วารสารวิจัย มข.11; 53-61
- นเรศ ช้วนยุก, หิรัญ กังแฮ, เรวัตร์ คงประดิษฐ์ และ กิจการ สุขมาตย์. 2009. โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*). Vet. Microbiol., 14, 180–183.
- Akinbowale, O.L., Peng, H. and Barton, M.D. 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. J. Appl. Microbiol., 100; 1103-1113.
- Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Mattila-Sandholm, T. and von Wright, A. 1999. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. Appl. Environ. Microbiol., 65; 351–354.
- Alexopoulos, C., Georgoulakis, I.E., Tzivara, A., Kritas, S.K., Siochu, A. and Kyriakis, S.C. 2004. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl), 88; 381-392.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaeffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res., 25; 3389-3402.
- Alvandi, S.V., Vijayan, K.K., Santiago. T.C., Poornima. M., Jithendran, K.P., Ali, S.A. and Rajan, J.J.S. 2004. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol., 17; 115–120.
- Atassi, F., Brassart, D., Grob, P., Graf, R. and Servin, A.L. 2006. *Lactobacillus* strains isolated from the vaginal microbiota of healthy women inhibit *Prevotella bivia* and *Gardnerella vaginalis* in coculture and cell culture. FEM Patho. Diseases, ; 48; 424-432.

- Austin, B. and Austin, D.A., 1999. Bacterial fish pathogens: Diseases of farmed and wild fish, 3rd ed. Springer-Praxis, London. 457 pp.
- Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, P.A.W., Effendi, I. and Griffith, D.R.W. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. J. Fish Dis., 18; 93-96.
- Bairagi, A., Sarkar Ghosh, K., Sen, S.K. and Ray, A.K. 2004. Evaluation of the nutritive value of *Leucaena leucocephala* leaf meal, inoculated with fish intestinal bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus circulans* in formulated diets for rohu, *Labeo rohita* (Hamilton) fingerlings. Aquac. Res., 35; 436–446.
- Balcázar J.L, Blas, I.D., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D. and Múzquiz, J.L. 2006. The role of probiotics in aquaculture. Vet. Microbiol., 114; 173-86.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Vendrell, D., Calvo, A.C., Márquez, I., Gironés, O. and Muzquiz, J.L. 2007. Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). Br. J. Nutr. 97; 522–527.
- Balcázar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzauiz, J.L. and Girones, O. 2008. Short communication; characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture, 208: 188-191.
- Balcázar, J.L., Vendrell, D., Blasmanol, I., Ruiz-Zarzuela, O., José, G. and Múzquiz L. 2007. *In vitro* competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. Vet. Microbiol., 122; 373-380.
- Banasaz, M., Norin, E., Holma, R., and Midtvedt, T. 2002. Increased enterocyte production in gnotobiotic rats monoassociated with *Lactobacillus rhamnosus* GG. Appl. Environ. Microbiol., 68; 3031–3034.
- Barbosa, T.M., Serra, C.R., La Ragione, R.M., Woodward, M.J. and Henriques, A.O. 2005. Screening for *Bacillus* isolates in the broiler gastrointestinal tract. Appl. Environ. Microbiol., 71; 968–978.
- Bengmark, S. 1998. Ecological control of the gastrointestinal tract: the role of probiotic flora. Gut. 42; 2-7
- Blum, S., Reniero, R., Schiffrin, E.J., Crittenden, R., Mattila-Sandholm, T., Ouwehand, A.C., Salminen, S., von Wright, A., Sarela, M., Saxelin, M., Collin, K. and Morelli, L. 1999.

- Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends Food Sci. Technol.*, 10; 405-410.
- Boris, S. and Barbes, C. 2000. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbiol. Infect.*, 2; 543-546.
- Brosius, J., Dull, T.J., Sleeter, D.D. and Noller, H.F. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 148; 107-127.
- Bujnakova, D. and Kmet, V. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Folia Microbiol.*, 57; 263–267.
- Candela, M., Perna, F., Carnevali, P., Vatali, B., Ciati, R., Gionchetti, P., Rizzello, F., Camieri, M. and Brigidi, P. 2008. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int. J. Food Microbiol.*, 125; 286-292.
- Cebeci, A. and Gürakan, C. 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiol.*, 20; 511-518.
- Chabrilón, M., Rico, R.M., Balebona, M.C. and Moriñigo, M.A., 2005. Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J. Fish Dis.*, 28; 229–237.
- Cohen, P.S. and Laux, D.C. 1995. Bacterial adhesion to and penetration of intestinal mucous in vitro. *Methods Enzymol.*, 253; 309–314.
- Collado, M.C., Meriluoto, J. and Salminen, S. 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strain. *Eur. Food Res. Technol.*, 226; 1065-1073.
- Collado, M.C., Gueimonde, M., Hernandez, M., Sanz, Y. and Salminen, S. 2005. Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and its role in enteropathogen exclusion. *J. Food Protect.* 68; 2672-2678.
- Decamp, O. and Moriarty, D.J.W. 2006. Probiotics as alternative to antimicrobials: limitations and potential. *World Aquaculture*, 37; 60–62.

- Delsol, A.A., Randall, L., Cooles, S., Woodward, M.J., Sunderland, J. and Roe, J.M. 2005. Effect of the growth promoter avilamycin on emergence and persistence of antimicrobial resistance in enteric bacteria in pig. *J. Appl. Microbiol.*, 98: 564-571.
- Farzanfar, A. 2006. Minireview; The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 48; 149-158.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, 66; 365-378.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E. and Ringo, E. 1997. Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia*, 352; 279-285.
- Gismondo, M.R., Drago, L. and Lomb, A. 1999. Reviews of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 12; 287-292.
- Gorbach, S.L. 2000. Probiotics and gastrointestinal health. *Am. J. Gastroenterol.*, 95; S2-S4.
- Gorbach, S.L., Chang, T.W., and Goldin, B. 1987. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *Lancet*, 2; 1519.
- Gueimonde, M., Jalonen, L., He, F., Hiramatsu, M. and Salminen, S. 2006. Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food Res. Inter.*, 39; 467-471.
- Gusilsetal, C., Palacios, J., Gonzales, S. and Oliver, G. 1999. Lectin-like protein fractions in lactic acid bacteria isolated from chickens. *Biol. Pharm. Bull.*, 22; 11-15.
- Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y. and Hoshino, T. 2004. Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. *Aquaculture*, 234: 335-346.
- Handley, P.S., Harty, D.W.S., Wyatt, J.E., Brown, C.R., Doran, J.P. and Gibbs, A.C.C. 1987. A comparison of the adhesion, coaggregation and cell-surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of *Streptococcus salivarius*. *J. Gen. Microbiol.*, 133; 3207-3217.
- Hansen, G.H. and Olafsen, J.A. 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecol.*, 38; 1-26.
- Hazen, T.C., Fliermans, C.B., Hirsh, R.P. and Esch, G.W. 1978. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 36; 731-738.

- Heckman, R. 2004. What else can happen? Other problems for fish production. *Aqua. Mag.*, 30 (3): 27–40.
- <http://www.thai-tour.com/eng/narathiwat/sirindhorn-peat-swamp-forest/>
- <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.htm>
- <http://eztaxon-e.ezbiocloud.netf>
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. and Huis in't Veld, J.H.J. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, 41; 85-101.
- Irianto, A. and Austin, B. 2002. Probiotics in aquaculture. *J. Fish. Dis.*, 25: 633–642.
- Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Noboru, T., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M. and Takahashi, Y. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*, 164; 277–288.
- Jöborn, A., Olsson, J.C., Westerdahl, A., Conway, P.L. and Kjelleberg, S. 1997. Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucous and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. strain Kl. *J. Fish Dis.*, 20: 383–392.
- Katsura, K., Kawasaki, H., Potacharoen, W., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. and Komagata, K. 2001. *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51; 559-563.
- Kawasaki, H., Hoshino, Y., Hirata, A. and Yamasato, K. 1993. Is intracytoplasmic membrane structure a generic criterion? It does not coincide with phylogenetic interrelationships among photosynthetic purple non-sulfur bacteria. *Arch. Microbiol.*, 160; 358-362.
- Kennedy, S.B., Tucker, J.W.J., Thomersen, M. and Sennett, D.G. 1998. Current microbiology for the use of probiotic bacteria in the culture marine fish larvae. *Aquaculture'98 Book of Abstracts*, p.286. World Aquaculture Society, Las Vegas, USA.
- Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S. and Chun, J. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst. Evol. Microbiol.*, 62; 716–721.
- Kimoto, H., Kurisaki, J., Tsuji, N.M., Ohmomo, S. and Okamoto, T. 1999. *Lactococci* as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29; 313–316.

- Kiran, G.S., Priyadarshini, S., Anitha, K., Gnanamani, E. and Selvin, J. 2015. Characterization of an exopolysaccharide from probiont *Enterobacter faecalis* MSI12 and its effect on the disruption of *Candida albicans* biofilm. *RSC Advances*. 5; 71573-71585.
- Landis, S.J. 2008. Chronic wound infection and antimicrobial use. *Adv. Skin Wound Care*, 21; 531–540.
- Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Perea Velez, M., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S.C.J. 2007. Impact of environmental and genetic factors on biofilms formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73; 6768–6775.
- Lee, Y.K, Puong, K.Y., Ouwehand, A.C. and Salminen, S. 2003. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J. Med. Microbiol.*, 52; 925-930.
- Lewandawska, M., Olejnik, A., Neumann, M., Krepulec, A., Piotrowska, J., Teresiak, A., Grajeklin, W. 2005. Comparative in vitro study on the adhesion of probiotic and pathogenic bacteria to different human intestinal cell lines. *Biotechnologia*. 2005; 215-233.
- Lewis K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45; 999-1007.
- Lowry, O.H, Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 19: 265–275.
- Martin, R., Martin, C., Escobedo, S., Suárez, J.E. and Quirós, L.M. 2013. Surface glycosaminoglycans mediate adherence between HeLa cells and *Lactobacillus salivarius* Lv72. *MBC Microbiol.*, 13; 210-210.
- Marzorati, M., Van den Abbeele, P., Possemiers, S., Benner, J., Verstraete, W. and Van de Wiele, T. 2011. Studying the host-microbiota interaction in the human gastrointestinal tract: basic concepts and in vitro approaches. *Ann. Microbiol.*, 61; 709-715.
- Matijasic, B.B., Narat, M., Peternel, M.Z. and Rogeli, I. 2006. Ability of *Lactobacillus gasseri* K7 to inhibit *Escherichia coli* adhesion in vitro on Caco-2 cell and ex vivo on pig's jejunal tissue. *Int. J. Food Microbiol.*, 107; 92-96.

- Miller, R.S., and Hoskins, L.C. 1981. Mucus degradation in human colon ecosystems; faecal population densities of mucus degrading bacteria estimated by a 'most probable number' method. *Gastroenterology*, 81; 759–765.
- Morelli, L. 2007. *In vitro* assessment of probiotic bacteria: from survival to functionality. *Int. Dairy J.*, 17; 1278-1283.
- Moriarty, D.J.W. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: Bell, C.R., Brylinsky, M., Johnson-Green, P. (Eds.), *Microbial Biosystems: New Frontiers: Proceeding of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Morohoshi, T., Nakazawa, S., Ebata, A., Kato, N. and Ikeda, T. 2008. Identification and characterization of N acylhomoserine lactone acylase from the fish intestinal *Shewanella* sp. strain MIB015. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72; 1887–1893.
- Mosbah, A. and Mosbah, M.R. 2009. A study of the role of hydrogen peroxide production by lactobacilli in preterm labor. *Int. J. Med. Sci.*, 1; 388-395.
- Mukai, T., Arihara, K. and Itoh, H. 1992. Lectin-like activity of *Lactobacillus acidophilus* strain JCM1026. *FEMS Microbiol. Lett.*, 98; 71–74.
- Nagoba, B., Wadher, B., Kulkarni, P. and Kolhe, S. 2008. Acetic acid treatment of pseudomonal wound infections. *Eur. J. Gen. Med.*, 5; 104–106.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-9th ed. Mo7-A9. Villanova: nNCCLS, . 2012
- Nawaz, M.S., Erickson, B.D., Khan, A.A., Khan, S.A., Pothuluri, J.V., Rafii, F., Sutherland, J.B., Wagner, R.D. and Cemiglia, C.E. 2001. Human health impact and regulatory issues involving antimicrobial resistance in the food animal production environment. *Reg. Res. Perspect.*, 1; 1-10.
- Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A.H. and Austin, B. 2014. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture*, 431; 1-11.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Bylund, G., Salminen, S. and Lilius, E.M. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol.*, 15; 443–452.

- Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bulund, R. and Ouwehand, A.C. 2001. Characterization of the properties of human- and dairy-derived probiotics for prevention of infectious diseases in fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67; 2430-2435.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Groñnlund, M.M., Isolauri, E. and Salminen, S. 1999. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *Int. Dairy J.*, 9; 623–630.
- Pascual, L.M., Daniele, M.B., Giordano, W., Pájaro, M.C. and Barberis, I.L. 2008. Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Curr. Microbiol.*, 56; 397-402.
- Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlioux, P. and Bellon-Fontaine, M.N. 1997. Cell surface characterization of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63; 1725-1731.
- Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R. and Waddell, J. 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J. Antimicrob. Chemother.*, 53; 28-52.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J. and Gopal, P.K. 1998. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy J.*, 8; 993-102.
- Rengpipat, S., Tunyamum, A., Fast, A.W., Piyatiratitivoraku, S. and Menasveta, P. 2003. Enhanced growth and resistance to vibrio challenge in pond-reared black tiger shrimp *Panaeus monodon* fed a *Bacillus* probiotic. *Dis. Aquat. Org.*, 55; 169-173.
- Rico-Mora, R., Voltolina, D. and Villaescusa-Celaya, J.A., 1998. Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures. *Aquacult. Eng.*, 19; 1–6.
- Ringø, E. and Gatesoupe, F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, 160; 177–203.
- Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S. and Ouwehand, A.C. 2003. Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization? *Vet. Microbiol.*, 92; 111–119.

- Ryu, E.H. and Chang, H.C. 2013. *In vitro* study of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from kimchi. *Ann. Microbiol.*, 63; 1387-1395.
- Salas-Jara, M.J. Ilabaca, A., Vega, M. and García, A. 2016. Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics. *Microorganism*, 4(3); 35-40
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteu, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fonde'n R. Saxelin, M., Collin., K., Mogensen, G., Birkeland, S.E. and Sandholm, T.M. 1998. Demonstration of safety of probiotics- a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 44; 93-106.
- Sanders, M.E., Morelli, L. and Tompkins, T.A. 2003. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevobacillus* *Compre. Rev. Food Sci. F.*, 2; 101-110.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C. and Walsh, T.R. 2001. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 17; 431-437.
- Senok, A.C., Ismaeel, A.Y. and Botta, G.A. 2005. Probiotics: facts and myths. *Clin. Microbiol. Infec.*, 11; 958–966.
- Servin, A. and Coconnier, M.H., 2003. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 17; 741–754.
- Solomon, S.G., Ataguba, G.A. and Abeje, A. 2011. Water stability and floatation test of fish pellets using local starch sources and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Int. J. Latest Trend. Agricul. Food Sci.*, 1: 1-5.
- Stober, H., Maier, E. and Schmidt, H. 2010. Protective effect of *Lactobacilli*, *Bifidobacterium* and *Staphylococci* on the infection of cultured HT29 cells with different enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes are strain-specific. *Int. J. Food Microbiol.*, 144; 133-140.
- Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacific, S. and Coppola, R. 2005. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano Chesse. *FEMS Microbiol. Let.*, 244; 129-137.
- Sugita, H., Shibuya, K., Shimooka, H. and Deguchi, Y. 1996. Antibacterial abilities of intestinal bacteria in freshwater cultured fish. *Aquaculture*, 145: 195-203.
- Sullivan, A. and Nord, C.E. 2002. The place of probiotics in human intestinal infections. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 20: 313–319.

- Thirabunyanon, M. and Thongwittaya, N. 2012. Protection activity of a novel probiotic strain of *Bacillus subtilis* against *Salmonella* Enteritidis infection. Res. Vet. Sci., 93; 74-81.
- Tropcheva, R., Georgieva, R. and Danova, S. 2011. Adhesion ability of *Lactobacillus plantarum* AC131. Biotchnol. Biological. Equip., 25; 121-124.
- Turchi, B., Mancini, S., Fratini, F., Pedonese, F., Nuvoloni, R., Bertelloni, F., Ebani, V.V. and Cerri, D. 2013. Preliminary evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Italian food products. Word J. Microbiol. Biotechnol., 29; 1-10.
- Van den Bogaard, A.E. and Stobberingh, E.E. 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics: links between animals and humans Int. J. Antimicrob. Ag., 14; 327-335.
- Van der Aa Kühle, A., Skovgaard, K. and Jespersen, L. 2005. *In vitro* screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and foodborne *Saccharomyces cerevisiae* strains. Int. J. Food Microbiol., 101; 29–39.
- Vaseeharan, B. and Ramasamy, P. 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus nonodon*. Lett. Appl. Microbiol. 36; 83-87.
- Vaughan, E.E., de Vries, M.C., Zoetendal, E.G., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D.L. and de Vos, W.M. 2002. The intestinal LABs. Antonie van Leeuwenkoek, 82; 341-352.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Huys, G., Dhont, J., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. 1999. Microbial control of the culture of *Artemia juveniles* through presumptive colonization by selected bacterial strains. Appl. Environ. Microbiol., 65: 2527–2533.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. and Verstraete, W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol. Mol. Biol. R., 64: 655–671.
- Vine, N.G., Leukes, W.D. and Kaiser, H. 2004. *In vitro* growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. FEMS Microbiol. Lett., 231; 145–152.
- Wierup, M. 2001. The experience of reducing antibiotics used in animal production in the Nordic countries. Int. J. Antimicrob. Ag., 18; 287-290.
- Wiwattanapatapee, R., Pengnoo, A., Kanjanamaneesathian, M., Matchavanich, W., Nilratana, L. and Jantharangsri, A. 2004. Floating pellets containing bacterial antagonist for control sheath blight of rice: formulations, viability and bacterial release studies. J. Control. Release, 95; 455-462.

- Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Uchimura, T., and Komagata, K. 2000. *Asaiabogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50; 823-829.
- Yan, F. and Polk, B. 2012. *Lactobacillus rhamnosus* GG: An updated strategy to use microbial products to promote health. *Funct. Food Rev.*, 4; 77-84.
- Yu, Z., Zhang, X., Li, S., Li, C., Li, D. and Yang, Z. 2013. Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese sauerkraut. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 29; 489-498.
- Zhang, Y.C., Zhang, L.W., Tuo, Y.F., Guo, C.F., Yi, H.X., Li, J.Y., Han, X. and Du, M. 2010. Inhibition of *Shigella sonnei* adherence to HT-29 cells by lactobacilli from Chinese fermented and preliminary characterization of S-layer protein involvement. *Res. Microbiol.*, 161; 667-672.
-

ประวัติผู้ทำวิจัย (หัวหน้าโครงการวิจัย)

ชื่อ-สกุล รศ.ดร. เสน่ห์ แก้วนพรัตน์

Assoc,Prof.Dr.Sanae Kaewnopparat

วัน-เดือน-ปี เกิด: 30 กรกฎาคม 2502

วุฒิการศึกษา:

- 2525 วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา): วท.บ.(ชีววิทยา)
สถาบัน: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- 2528 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชศาสตร์): วท.ม.(เภสัชศาสตร์)
สถาบัน: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
- 2541 ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์ชีวภาพ): ปร.ด.(เภสัชศาสตร์ชีวภาพ)
สถาบัน: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล



สถานที่ติดต่อ

ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

โทรศัพท์: ++66-74-288902, 086-2992012

โทรสาร: ++66-74-428148

Email: sanae.k@psu.ac.th

ผลงานวิชาการที่ตีพิมพ์:

Kaewiad, K., Kaewnopparat, N., Faroongsarng, D., Wungsintaweekul, J., Kaewnopparat,

S. Statistical optimization of bambara groundnut protein isolate-alginate matrix system on survival of encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG. AIMS microbiology 2017, 3(4): 713-732.

Kaewiad,K., Kaewnopparat, N, **Kaewnopparat, S.** Optimiasation of bambara groundnut water extract and skim milk compositions as cryoprotectant for increasing cell viability of *Lactobacillus* spp. using response surface methodology. International Journal of Food Scinence and Tecnolgy 2016, 51: 2630-2639.

Kaewiad, K., **Kaewnopparat, S.**, Kaewnopparat, N. *In vitro* Comparison of probiotic properties of *Lactobacillus fermentum*SK54 isolated from new born baby with

Lactobacillus rhamnosus GG ATCC 53103 Advanced Materials Research Vol. 1060 (2015): 215-218.

- Kaewnopparat, S., Dangmanee, N., Kaewnopparat, N., Srichana, T., Chulasiri, M. and Settharaksa, S. In vitro probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Anaerobe* 2013; 22: 6-13.
- Shoosanglertwijit, J., **Kaewnopparat, S.**, Yongmaitreesakul, B., Pattayananthavej.S. and Kaewnopparat, N. Physical, chemical and microbiological stability of extemporaneous furosemide suspensions. *Asian Biomedicine*. 2011; 5 (5): 681-686.
- Niyomkam, P. Kaewbumrung, S., **Kaewnopparat, S.** and Panichayupakaranant, P. Antibacterial activity of Thai herbal extracts on acne involved microorganism. *Pharmaceutical Biology*. 2010; 48(4): 375-380.
- Kaewnopparat, S.** and Kaewnopparat, N. Formulation and evaluation of vaginal suppositories containing lactobacillus. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 2009; 55: 645-648.
- Kaewnopparat, N., **Kaewnopparat, S.**, Jangwang, A., Maneenaun, D., Chuchome, T. and Panichayupakaranant, P. Increased Solubility, Dissolution and Physicochemical Studies of Curcumin-Polyvinylpyrrolidone K-30 Solid Dispersions. *World Academy of Science, Engineer and Technology*.2009; 55: 229-234.
- Pangsomboon, K., Bamsal, S., Martin, G. P., suntinanalert, P., **Kaewnopparat, S.** and Srichana, T. Further characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* HL32. *Journal of Applied. Microbiology* 2009; 106: 1928-1940.
- Kaewnopparat, N., Chuchom, T., Sunthornpit, A., Jangwang, A., **Kaewnopparat, S.** Enhanced bromhexine hydrochloride solubility and dissolution by complexation with methylated beta-cyclodextrin. *Isan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 5(2): 114-122, 2009.
- Suedee, R., Bodhibukkana, C., Tangthong, N., Amnuaiakit, C., **Kaewnopparat, S.** and Srechana, T. Development of a reservoir-type transdermal enantioselective-controlled delivery system for racemic propranolol using a molecularly imprinted polymer composite membrane. *Journal of Controlled Release* 2008; 129: 170-178.
- Kaewnopparat, S.**, Sansernluk, K. and Faroongsarng, D. Behavior of freezable bound water in the bacterial cellulose produced by *Acetobacte xylinum*: An approach using thermoporosimetry. *AAPS PharmSciTech* 2008; 9: 701-707.

- Kaewsrichan, J., Chandarjoti, K., **Kaewnopparat, S.** and Kaewnopparat, N. Evaluation of lactobacilli containing suppository formulation for probiotic use. Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences 2007; 34 (1-4): 1-8.
- Pangsomboon, K., **Kaewnopparat, S.**, Pitakpornpreecha, T. and Srichana, T. Antibacterial activity of a bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* HL32 against *Porphyromonas gingivalis*. Archives Oral Biology 2006; 51: 784-793.
- Bodhibukkana, C., Srichana, T., **Kaewnopparat, S.**, Tangthong, N., Bouking, P., Martin, G.P. and Suedee, R. Composite membrane of bacterially-derived cellulose and molecularly imprinted polymer for use as a transdermal enantioselective controlled-release system of racemic propranolol. Journal of Controlled Release 2006; 113: 43-56.
- Kaewnopparat, N., Oungpho, K., **Kaewnopparat, S.**, Rittirod, T., Rojanarat, W. and Tessiri, T. Preparation of extemporaneously diazepam suppositories: In vitro release and aging study. Isan Journal of Pharmaceutical Sciences. 2006; 2(1): 26-34.
- Wiwattanawongsa, K., Tantishaiyakul, V., Lomlim, L., Rojanasakul, Y., Pinsuwan, S. and **Kaewnopparat, S.** Experimental and computational studies of epithelial transport of mefenamic acid ester prodrugs. Pharmaceutical Research 2005; 22: 721-727.
- Kaewnopparat, N., **Kaewnopparat, S.**, Rojanarat, N. and Ingkathawornwong, S. 2004. Enhanced release of diazepam from hollow-type suppositories. International Journal of Pharmaceutical Compounding 2004; 8(4): 210-312.
- Wanichapichart, P., **Kaewnopparat, S.**, Buaking, K. and Puthai, W. Characterization of cellulose membranes produced by *Acetobacter xylinum*. Songklanakarin Journal of Science and Technology 2003; 24 (Suppl.): 855-862.
- Tantishaiyakul, V., Wiwattanawongsa, K., Pinsuwan, S., Kasiwong, S., Phadoongsombut, N., **Kaewnopparat, S.**, Kaewnopparat, N. and Rojanasakul, Y. Characterization of mefenamic acid guaiacol ester: stability and transport across Caco-2 cell monolayers. Pharmaceutical Research 2002; 19: 1013-1018.
- Sree-iam, S., **Kaewnopparat, S.** and Pinsuwan, S. Influence of clear liquid shampoo components on preservative activity of parabens. Thammasat International Journal of Science and Technology 1997; 2(2): 79-83.

มาลิน จุลศิริ, พวงแก้ว ลัคณาทินพร, พรพิมล หลวงอินทิม, **เสนห์ แก้วนพรัตน์**, ปริญญา นรมัตต์, แฮมเปิล, วอเนอร์. การใช้จุลินทรีย์เพื่อผลิตเครื่องดื่มโปรตีนชนิดใสพร้อมกลิ่นหอมจากถั่วเหลือง, วารสารสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ 33,2 (ก.ค.-ธ.ค.2544), 123-151.

ภญ.ดร. ชิตชไม โอวาทพารพร, **ดร.เสนห์ แก้วนพรัตน์**, จันทน์ผา ตันธนา และ สุปรีย์ดี สังข์รักษ์. การประเมินความปลอดภัยของอาหารที่จำหน่ายในสถานศึกษาในจังหวัดสงขลา. วารสารอาหารและยา, ปีที่ 13, ฉบับที่ 3/2549, เดือนกันยายน-ธันวาคม 2549, 54-64.

หนังสือ, ตำรา:

เสนห์ แก้วนพรัตน์ 2552 จุลชีววิทยาทางเทคโนโลยีเภสัชกรรม บริษัทลิมบราเดอร์การพิมพ์ จำกัด หาดใหญ่ สงขลา

เสนห์ แก้วนพรัตน์ 2551 คู่มือปฏิบัติการวิชา 580-573 จุลชีววิทยาทางเทคโนโลยีเภสัชกรรม (Microbiology in Pharmaceutical Technology) ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา

เสนห์ แก้วนพรัตน์ 2545 บทบาทของจุลชีววิทยาในทางเภสัชกรรม ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา

สุทธิมาลย์ อิงคถาวรวงศ์, **เสนห์ แก้วนพรัตน์**, วิชาญ เกตุจินดา. พ.ศ.2552. คู่มือปฏิบัติการเภสัชอุตสาหกรรม 2 ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา

เสนห์ แก้วนพรัตน์, ฤดีกร วิวัฒน์ปฐพี, ธีระพล ศรีชนะ, นัญฐา แก้วนพรัตน์, สิริวิศม์ ปิ่นสุวรรณ, ขวัญจิต อึ้งโพธิ์. 2543 รูปแบบเภสัชภัณฑ์เฉพาะที่ ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่ สงขลา



ประวัตินักวิจัย (ผู้ร่วมวิจัย)

Professor Dr. Supayang Piyawan Voravuthikunchai
 Department of Microbiology,
 Director of Natural Product Research Center of Excellence
 Faculty of Science, Prince of Songkla University
 Thailand 90112.
 Tel: 66-74-288321 (Office), 66-74-288340 (Laboratory)
 66-74-446661, 288311-2 (Department secretary)
 Fax: 66-74-446661
 E-mail: supayang.v@psu.ac.th



Education background:

Year	Degree/Certificate	Institution	Country
1979	B.Sc. (Hons) Microbiology/Biotechnology	The University of New South Wales	Australia
1980	Certificate (Modern Methodology for Teachers of Health Science)	BLAT Centre for Health and Medical Education/ World Health Organization	England
1986	Certificate (Infectious Diseases)	International Society for Infectious Diseases	
1989	Ph.D. (Microbiology)	The University of New South Wales	Australia
1997	Certificate (Infectious Diseases /Chemotherapy)	The University Hospital of Vienna	Austria
1998	Certificate (Advanced Microbial Diseases Study)	Japan International Cooperation Agency	Japan
1998	Certificate (Antimicrobial Agents/Verocytotoxin)	Osaka University	Japan

Publications:

1. Chusri S, Siriyong T, Na-Phatthalung P, **Voravuthikunchai SP**. 2014. Synergistic effects of ethnomedicinal plants of Apocynaceae family and antibiotics against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE* 2014: 456-461. **JIF = 0.502**.
2. Chusri S, Jangkai D, Limsuwan S, **Voravuthikunchai, SP**. 2014. Assessments of antibacterial activity, phytochemical constituents, and cytotoxicity of herbal preparations used in Thailand. *EUROPEAN JOURNAL OF INTEGRATIVE MEDICINE* 19: 671-676. **JIF = 0.56**.
3. Chusri S, Saitongtae K, Chokpaisarn J, Limsuwan S, **Voravuthikunchai SP**. 2014. Antagonistic interactions of 'Ya-Sa-Marn-Phlae' ethanol extract in combination with topical antiseptics against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL* 2014: Art. No. 867603. **JIF = 2.880**.
4. Chusri S, Na-Phatthalung P, Siriyong T, Paosen S, **Voravuthikunchai SP**. 2014. *Holarrhena antidysenteria* as a resistance modifying agent against *Acinetobacter baumannii*: its effects on bacterial outer membrane permeability and efflux pumps. *MICROBIOLOGICAL RESEARCH* 169: 417-424. **JIF = 2.31**.
5. Hounkong K, Sawangjaroen N, Pongcharoen W, Rukachaisirikul V, **Voravuthikunchai SP**, Phongpaichit S. 2014. Anti-intestinal protozoa activities of 1-hydroxy-2 hydroxymethylanthraquinone from

- Coptosapelta flavescens*. ASIAN PACIFIC JOURNAL OF TROPICAL DISEASE 4: 457-462.
6. Joycharat N, Thammavong, **Voravuthikunchai SP**, Plodpai P, Mitsuwan W, Limsuwan S, Subhadhirasakul S. 2014. Chemical constituents and antimicrobial properties of the essential oil and ethanol extract from the stem of *Aglaia odorata* Lour. NATURAL PRODUCT RESEARCH DOI:10.1080/14786419.2014.924934. **JIF = 1.009**.
 7. Limsuwan S, Homlaead S, **Voravuthikunchai SP**. 2014. Inhibitory effects of *Rhodomyrtus tomentosa* leaf extract on biofilm formation of *Streptococcus mutans*. ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY 59: 1256-1265. **JIF = 1.905**.
 8. Saising J, Gotz F, Dube L, Ziebandt A, **Voravuthikunchai SP**. 2014. Inhibition of staphylococcal biofilm-related gene transcription by rhodomyrtone, a new antibacterial agent. ANNALS OF MICROBIOLOGY DOI: 10.1007/s13213-014-0904-1. **JIF = 1.549**.
 9. Shankar S, Chorachoo J, Jaiswal L, **Voravuthikunchai SP**. 2014. Effect of reducing agent concentrations and temperature on characteristics and antimicrobial activity of silver nanoparticles. MATERIALS LETTERS 137: 160-163. **JIF = 2.22**.
 10. Srisuwan S, Srیمانote P, **Voravuthikunchai SP**. 2014. Rhodomyrtone modulates innate immune responses in clearing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in THP-1 monocytes. PLOS ONE PONE-D-14-09732. (Accepted). **JIF = 4.092**.
 11. Sriyatep T, Chakthong S, Leejae S, **Voravuthikunchai SP**. 2014. Two lignans, one alkaloid, and flavanone from the twigs of *Feroniella lucida*. TETRAHEDRON 70: 1773-1779. **JIF = 2.803**.
 12. Chorachoo J, Amnuakit T, **Voravuthikunchai SP**. 2013. Liposomal encapsulated rhodomyrtone: A novel antiacne drug. Evid.-based Complement Altern. Med. 2013: Art. No. 157635.
 13. Chusri S, Siriyong T, Na-Phatthalung P, **Voravuthikunchai SP**. 2013. Synergistic effects of ethnomedicinal plants of Apocynaceae family and antibiotics against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Asian Pac. J. Trop. Med.
 14. Chusri S, Na-Phatthalung P, Siriyong T, Paosen S, **Voravuthikunchai SP**. 2013. *Holarrhena antidysenteria* as a resistance modifying agent against *Acinetobacter baumannii*: its effects on bacterial outer membrane permeability and efflux pumps. Microbiol. Res. doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.00.
 15. Chusri S, Jittanon W, Maneenoon K, **Voravuthikunchai SP**. 2013. An effective antibiofilm agent against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm from traditional Thai herbal recipes used for wound treatments. Microb. Drug Resist 19: 337-343.
 16. Chusri S, Settharaksa S, Chokpaisarn J, Limsuwan S, **Voravuthikunchai SP**. 2013. Thai herbal formulas used for wound treatment: A study of their antibacterial potency, anti-inflammatory, anti-oxidant, and cytotoxicity effects. J. Altern. Comp. Med. 19: 671-676.
 17. Indrawattana N, Sungkhachat O, Sookkrung N, Chongsa-nguan M, Tungtrongchitr A, **Voravuthikunchai SP**, Kong-ngoen T, Kurazono H, Chaicumpa W. 2013. *Staphylococcus aureus* clinical isolates: antibiotic susceptibility, molecular characteristics and ability to form biofilm. Biomed. Res. Inter. 2013 Art. No. 314654, 11 pages.
 18. Joycharat N, Thammavong S, Limsuwan S, Homlaead S, **Voravuthikunchai SP**, Yingyongnarongkul B, Dej-adisai S, Subhadhirasakul S. 2013. Antibacterial substances from *Albizia myriophylla* wood against cariogenic *Streptococcus mutans*. Arch. Pharm. Res. 36: 723-730.
 19. Leejae S, **Voravuthikunchai SP**. 2013. Inhibition of staphyloxanthin biosynthesis in *Staphylococcus aureus* by rhodomyrtone, a novel antibiotic candidate. J. Med. Microbiol. 62: 421-428.
 20. Leejae S, Taylor P, **Voravuthikunchai SP**. 2013. Antibacterial mechanisms of rhodomyrtone against important hospital-acquired antibiotic-resistant pathogenic bacteria. J. Med. Microbiol. 62: 78-85.
 21. Limsuwan S, **Voravuthikunchai SP**. 2013. Bactericidal, bacteriolytic, and antibacterial virulence activities of *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr. extract against *Streptococcus pyogenes*. Trop. J. Pharm. Res. 12: 1023-1028.
 22. Limsuwan S, **Voravuthikunchai SP**. 2013. Anti-*Streptococcus pyogenes* activity of selected medicinal plant extracts used in Thai traditional medicine. Trop. J. Pharm. Res. 12: 535-540.
 23. Limsuwan S, Chusri S, Mitsuwan W, **Voravuthikunchai SP**. 2013. Anti-quorum sensing activity of Thai medicinal plants used in Thai traditional medicine for infections. J. Pure. Appl. Microbiol. 7: 1717-1724.
 24. Panthong K, Tohdee K, Hutadilok-Towatana N, **Voravuthikunchai SP**, Chusri S. 2013. Prenylated flavone from roots of a hybrid between *Artocarpus heterophyllus* and *Artocarpus integer* and its biological activities. 2013. J. Braz. Chem. Soc. 24: 1656-1661.

25. Panthong K, Srisud Y, Hutadilok-Towatana N, Voravuthikunchai SP, Tewtrakul S. 2013. Benzene, coumarin and quinolinone derivatives from the roots of *Citrus hystrix*. *Phytochemistry* 88: 79-84.
 26. Phoem NA, **Voravuthikunchai SP**. 2013. *Eleutherine americana* as a growth promoter for infant intestinal microbiota. *Anaerobe* 20: 14-19.
 27. Plodpai P, Petcharat V, Chuenchit S, Chakthong S, Joycharat N, **Voravuthikunchai SP**. 2013. Anti-*Rhizoctonia solani* activity by *Desmos chinensis* extracts and its mechanisms of action. *Crop Prot.* 43: 65-71.
 28. Plodpai P, Petcharat V, Chuenchit S, Chakthong S, **Voravuthikunchai SP**. 2013. *Desmos chinensis*: A new candidate as natural antifungal agent to control rice diseases. *Ind. Crop. Prod.* 42: 324-331.
 29. Chakthong S, Wearyee P, Puangphet P, Mahabusarakam W, Plodpai P, **Voravuthikunchai SP**, Kanjana-Opas A. 2012. Alkaloid and coumarins from the green fruits of *Aegle marmelos*. *Phytochemistry* 75: 108-113.
 30. Chusri S, Chaicoch N, Thongza-ard W, Limsuwan S, **Voravuthikunchai SP**. 2012. *In vitro* antibacterial activity of ethanol extracts of medicinal plant formulas used for skin infections. *J. Med. Plants Res.* 6: 5616-5623.
 31. Chusri S, Sompetch K, Mukdee S, Jansrisewangwong S, Srichai T, Maneenoon K, Limsuwan S, **Voravuthikunchai SP**. 2012. Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by traditional Thai herbal formulas used for wound treatment. *Evid.-based Complement Altern. Med.* 2012: Art. No. 159797.
 32. Chusri S, Subhadhirasakul S, Tahyoh N, Billateh C, Chaowuttikul C, Chorachoo J, Voravuthikunchai SP. 2012. Effects of different decontamination methods on microbiological aspects, bioactive constituents, and antibacterial activity of turmeric (*Curcuma longa* Linn.). *Eu. J. Med. Plant* 2: 276-289.
 33. Chusri S, Na-Phatthalung P, **Voravuthikunchai SP**. 2012. Anti-biofilm activity of *Quercus infectoria* G. Olivier against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 54: 511-517.
 34. Hiranrat A, Chitbankluoi, Mahabusarakam W, Limsuwan S, **Voravuthikunchai SP**. 2012. A new flavellagic acid derivative and phloroglucinol from *Rhodomyrtus tomentosa*. *Nat. Prod. Res.* 26: 1904-1909.
 35. Joycharat N, Limsuwan S, Subhadhirasakul S, **Voravuthikunchai SP**, Pratumwan S, MAD-A-Hin I, Nuankaew W, Promsawat A. 2012. Anti-*Streptococcus mutans* efficacy of Thai herbal formula used as a remedy for dental caries. *Pharm. Biol.* 50: 941-947.
 36. Lavanya G, Hutadilok-Towatana N, **Voravuthikunchai SP**. 2012. Acetone extract from *Rhodomyrtus tomentosa*: A potent natural antioxidant. *Evid.-based Complement Altern. Med.* 2012: Art. No. 535479.
 37. Leejae S, Yingyongnarongkul B, Suksamrarn A, **Voravuthikunchai SP**. 2012. Synthesis and structure-antibacterial activity relationship of rhodomyrtone derivatives. *Chin. Chem. Lett.* 23: 1011-1014.
 38. Limsuwan S, Kayser O, **Voravuthikunchai SP**. 2012. Antibacterial activity of *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. leaf extract against clinical isolates of *Streptococcus pyogenes*. *Evid.-based Complement Altern. Med.* 2012: Art. No. 697183.
 39. Na Phatthalung P, Chusri S, **Voravuthikunchai SP**. 2012. Thai ethnomedicinal plants as resistant modifying agents for combating *Acinetobacter baumannii*. *BMC Complement. Altern. Med.* 2012: Art. No. 56.
 40. Phoem NA, **Voravuthikunchai SP**. 2012. Growth stimulation/inhibition effect of medicinal plants on intestinal microbiota. *Food Sci. Biotech.* 21: 739-741.
 41. Riyajan S, Chusri S, **Voravuthikunchai SP**. 2012. Mechanical properties and cure test of a natural rubber/poly (vinyl alcohol) blend. *Rubber Chem. Technol.* 85: 147-156.
 42. Saising J, **Voravuthikunchai SP**. 2012. Anti *Propionibacterium acnes* activity of rhodomyrtone, an effective compound from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. leaves. *Anaerobe* 18: 400-404.
- Top 10 Articles Published in the Same Domain in BioMedLib
43. Saising J, Singdam S, Onsakul M, **Voravuthikunchai SP**. 2012. Lipase, protease, and biofilm as the major virulence factors in staphylococci isolated from acnes lesions. *Biosci. Trends* 6: 160-164.
 44. Sianglum W, Srimanote P, Taylor P, Rosado H, **Voravuthikunchai SP**. 2012. Transcriptomic analysis of responses to rhodomyrtone in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 7: Art. No. e45744.
 45. Tuntipaleepun M, Chakthong S, Ponglimanont C, Plodpai P, **Voravuthikunchai SP**. 2012. Antifungal and cytotoxic substances from the stem barks of *Desmos chinensis*. *Chin. Chem. Lett.* 23: 587-590.
 46. **Voravuthikunchai SP**, Minbutra S, Jerfferies J, Voravuthikunchai S, Lavanya G. 2012. Mixtures of essential oils in an air conditioning prototype to reduce the prevalence of airborne pathogenic bacteria. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* 15: 739-749.

47. **Voravuthikunchai SP**, Suwalak S, Mitranun W. 2012. Ellagitannin from *Quercus infectoria* eradicates intestinal colonization and prevents renal injuries in mice infected with *Escherichia coli* O157:H7. *J. Med. Microbiol.* 61: 1366-1372.
Top 20 Articles Published in the Same Domain in BioMedLib
Pictures selected as cover image in JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY 2012: October issue.
Pictures in Society for General Microbiology (SGM) quarterly magazine *Microbiology Today*.
Pictures in SGM's web page (www.sgm.ac.uk).
48. Chusri S, **Voravuthikunchai SP**. 2011. Damage of staphylococcal cytoplasmic membrane by *Quercus infectoria* G. Olivier and its components. *Lett. Appl. Microbiol.* 52: 565-572.
49. Kayser O, Limsuwan S, Heseling-Meinders, **Voravuthikunchai SP**, van Dijnl JM. 2011. Potential antibiotic and anti-infective effects of rhodomyrtone from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. on *Streptococcus pyogenes* as revealed by proteomics. *Planta Medica* 77: 1403-1403.
50. Limsuwan S, Heseling-Meinders, **Voravuthikunchai SP**, van Dijnl JM, Kayser O. 2011. Potential antibiotic and anti-infective effects of rhodomyrtone from *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. on *Streptococcus pyogenes* as revealed by proteomics. *Phytomedicine*.18: 934-940.
51. Saising J, Ongsakul M, **Voravuthikunchai SP**. 2011. *Rhodomyrtus tomentosa* (Aiton) Hassk. ethanol extract and rhodomyrtone: an potential strategy for the treatment of biofilm-forming staphylococci. *J. Med. Microbiol.* 60: 1793-1800.
Top 20 Articles Published in the Same Domain in BioMedLib
Electron micrograph selected as cover image in JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY 2012: February issue.
Pictures in Society for General Microbiology (SGM) quarterly magazine *Microbiology Today*.
Pictures in SGM's web page (www.sgm.ac.uk).
Top 20 Articles Published in the Same Domain in BioMedLib
52. Sianglum W, Srimanote P, Wonglumsom W, Kittinyom K, **Voravuthikunchai SP**. 2011. Proteome analyses of cellular proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated with rhodomyrtone, a novel antibiotic candidate. *PLoS ONE* 6: e16628.
53. Sirirak T, **Voravuthikunchai SP**. 2011. *Eleutherine americana*: A candidate for the control of *Campylobacter* spp. *Poul. Sci.* 90: 791-796.
54. Visutthi M, Srimanote P, **Voravuthikunchai SP**. 2011. Responses in the expression of extracellular proteins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* treated with rhodomyrtone. *J. Microbiol.* 49: 956-964.
55. Chakthong S, Chiraphan C, Jundee C, Chaowalit P, **Voravuthikunchai SP**. 2010. Alkyl phenols from the wood of *Averrhoa carambola*. *Chinese Chem. Lett.* 21: 1094-1096.
56. Fun HK, Joycharat N, **Voravuthikunchai SP**, Chantrapromma S. 2010. Absolute configuration of methyl isoeichlerialactone. *Crystallogr E* 66: o1604-o1605.

Ect

Books:

1. **Voravuthikunchai SP**, Ifesan B. 2010. Application of Natural Products in Food. Nova Science Publishers Inc., USA, 165 p. ISBN-13: 978-1608769988. Invited Author.
2. **Voravuthikunchai SP**, Ifesan B, Chusri S, Saising J. 2010. Bioactive natural products as anti-staphylococcal infections. *In: Gupta VK (eds), Comprehensive Bioactive Natural Products Vol. 1: Potential & Challenges.* Studium Press LLC, USA, ISBN 1-933699-50-7. pp. 23-74. Invited Author.
3. **Voravuthikunchai SP**, Limsuwan S, Chusri S. 2007. New perspectives on herbal medicines for bacterial infections. *In: Govil GN, Singh VK, Siddqui T. (eds), Recent Progress in Medicinal Plants Vol.18: Natural Products II.* Studium Press LLC, USA, ISBN 1-9336990-8-6. pp. 41-101. Invited Author.
4. **Voravuthikunchai SP**. 2004. The Identification of Gram-Positive & Gram-Negative Bacteria. Chulalongkorn University Press. ISBN 974-13-3229-7. 203 pp.

ประวัตินักวิจัย (ผู้ร่วมวิจัย)

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาวจุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล
 ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) Ms. Juraithip Wungsintaweekul
 2. หมายเลขประจำตัวประชาชน 3 8944 00350 67 4
 3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
 4. หน่วยงานที่สังกัดและที่ตั้ง ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์



คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

โทรศัพท์ 074-288887 โทรสาร 074-428220

e-mail address: juraithip.w@psu.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีการศึกษาที่จบ	ระดับการศึกษา	สถาบัน	สาขาวิชา
2535	ปริญญาตรี (เกียรตินิยมอันดับ 2)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	เภสัชศาสตร์
2538	ปริญญาโท	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	เภสัชเวช
2544	ป ร ิ ญ ญ า เ อ ก (Dr.rer.nat.)	Technical University of Munich	Biochemistry

ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในระดับชาติและระดับนานาชาติ

1. Limsuwanchote, S., Wungsintaweekul, J., Keawpradub, N., Putalun, W., Morimoto, S. and Tanaka, H. 2014. Development of indirect competitive ELISA for quantification of mitragynine in Kratom (*Mitragynaspeciosa* (Roxb.)Korth. Forensic Science International 244: 70-77
2. Limsuwanchote, S., Wungsintaweekul, J., Yusakul, G., Han, J.-Y., Sasaki-Tabata, K., Tanaka, H., Shoyama, Y and Morimoto, S. 2014. Preparation of a monoclonal antibody against notoginsenoside R1, a distinctive saponin from *Panaxnotoginseng*, and its application to indirect competitive ELISA. Planta Medica 80:337-342.
3. Charoonratana, T., Wungsintaweekul, J., Pathompak, P., Keawpradub, N., Georgiev, M.I., Choi, Y.H. and Verpoorte, R. 2013. Regulation of mitragynine biosynthesis by the shikimate

- pathway in *Mitragynaspeciosa* (Roxb.) Korth. ZeitschriftfürNaturforschung: section C. Accepted.
4. Charoonratana, T., Wungsintaweekul, J., Keawpradub, N. and Verpoorte, R. 2013. Molecular cloning and expression of tryptophan decarboxylase from *Mitragynaspeciosa*. *Acta Physiologiae Plantarum*. DOI: 10.0007/s11738-013-1296-8.
 5. Kongduang, D., De-Eknamkul, W., Sitthithaworn, W. and Wungsintaweekul, J. 2013. Terpenoid content and transcription profile analysis in callus and suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. *J. Plant Biochem. Biotech.* DOI:10.1007/s13562-012-0188-0.
 6. Premprasert, C., Tewtrakul, S., Plubrukarn, A. and Wungsintaweekul, J. 2013. Anti-inflammatory activity of diterpenes from *Croton stellatopilosus* on LPS-induced RAW264.7 cells. *J. Nat. Med.* Jan; 67(1), 174-181. DOI 10.1007/s11418-012-0668-5.
 7. Wungsintaweekul, J., Choo-malee, J., Charoonratana, T. and Keawpradub, N. 2012. Methyl jasmonate and yeast extract stimulate mitragynine production in *Mitragynaspeciosa* (Roxb.) Korth. shoot culture. *Biotech. Lett.* Oct; 34(10):1945-1950, DOI: 10.1007/s10529-012-0968-6.
 8. Kongduang, D., Wungsintaweekul, J. and De-Eknamkul, W. 2012. Established GC-FID for simultaneous determination of diterpenes and phytosterols in Plaunoi (*Croton stellatopilosus* Ohba). *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 34 (6), 623-628.
 9. Songkro, S., Pichayakorn, W., Sungkarak, S. and Wungsintaweekul, J. 2011. Investigation of Plaunoi-loaded micro/nanoemulsions for the treatment of dermatitis: formulation, evaluation and skin irritation studies. *J. Drug. Del. Sci. Tech.* 21(5), 401-410.
 10. Wungsintaweekul, J., Sitthithaworn, W., Putalun W., Pfeifhoffer, H.W., and Brantner, A. 2011. Antimicrobial, antioxidant activities and chemical composition of selected Thai spices. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 32 (6), 589-598.
 11. Songkro, S., Sirikatitham, A., Sungkarak, S., Buaking, K., Wungsintaweekul, J., Maneewan, D. and Oungbho, K. 2010. Characterization of Aromatherapy massage oils prepared from virgin coconut oil and some essential oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87(1), 93-107.
 12. Sitthithaworn, W., Wungsintaweekul, J., Sirisuntipong, T., Charoonratana, T., Ebizuka, Y. and De-Eknamkul, W. 2010. Plaunotol biosynthesis: cDNA cloning of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Croton stellatopilosus* and its expression profile along with 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase and geranylgeranyl diphosphate synthase. *J. Plant Physiol.* 167(4) 292-300.

13. Phongprueksapattana, S., Putalun, W., Keawpradub, N., and Wungsintaweekul, J. 2008. *Mitragynaspeciosa*: hairy root culture for triterpenoid production and high yield of mitragynine by regenerated plants. *Z. Naturforsch.* 63C, 691-698
14. Songkro, S., Wungsintaweekul, J. and Chartwaingam, S. 2008. Investigation of enhancing activity and skin irritation of *Zingiberofficinale*, *Zingiber cassumunar* and *Curcuma zedoaria*. *J. Drug Del. Sci. Tech.* 18(3), 169-179
15. Kongduang, D., Wungsintaweekul, J. and De-Eknamkul, W. 2008. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. *Tetrahedron Lett.* 49, 4067-4072.
16. Wungsintaweekul, J., Sirisuntipong, T., Kongduang, D., Losuphanporn, T., Ounaroon, A., Tansakul, P. and De-Eknamkul, W. 2008. Transcription profiles of genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase in plaunotol biosynthesis from *Croton stellatopilosus*. *Biol. Pharm. Bull.* 31(5), 852-856.
17. Treetharmathurot, B., Ovarlarnporn, C., Wungsintaweekul, J., Duncan R. and Wiwattanapatapee, R. 2008. Effect of PEG molecular weight and linking chemistry on the biological activity and thermal stability of PEGylated trypsin. *Int. J. Pharmaceutics.* 357, 252-259.
18. Wungsintaweekul, J., Sriyapai, C., Kaewkerd, S., Tewtrakul, S., Kongduang, D. and De-Eknamkul, W. 2007. Establishment of *Croton stellatopilosus* suspension culture for geranylgeraniol production and diterpenoid biosynthesis. *Z. Naturforsch.* 62C, 389-396.
19. Chatsiriwej, N., Wungsintaweekul, J. and Panichayupakaranant, P. 2006. Anthraquinone production in *Senna alata* root cultures. *Pharm. Biol.* 44, 416-420. [ทุนอุดหนุนเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 2549]
20. Wungsintaweekul, J. and De-Eknamkul, W. 2005. Biosynthesis of plaunotol in *Croton stellatopilosus* proceeds via the deoxyxylulose phosphate pathway. *Tetrahedron Lett.* 46(12), 2125-2128. [สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) 2002]
21. Wungsintaweekul, J., Sagner, S., Fellermeier, M., Zenk, M.H., Rohdich, F., Kis, K., Eisenreich, W., Schuhr, C.A., Hecht, S. and Bacher. 2005. Purification and characterization of novel enzymes in terpenoid biosynthesis. In *ISHS Acta Horticulturae 677: III WOCMAP Congress on Medicinal and Aromatic Plants-Vol.3: Perspectives in Natural Product Chemistry*. Eds Baser, K.H.C., Franz, G., Canigueral, Demirci, F., Craker, L.E, Garder, Z.E. vol. I., 115-122. [Sondersforschungsbereich 369, DFG, Germany]

22. Steinbacher, S., Kaiser, J., Wungsintaweekul, J., Hecht S., Eisenreich, W., Gerhardt, S., Bacher, A. and Rohdich, F. 2002. Structure of 2C-methyl-D-erythritol-2, 4-cyclodiphosphate synthase involved in mevalonate-independent biosynthesis of isoprenoids, *J. Mol. Bio.* 316(1), 79-88. [Sondersforschungsbereich 369, DFG, Germany]
23. Wungsintaweekul, J., Herz, S., Hecht, S., Eisenreich, W., Feicht, R., Rohdich, F., Bacher, A. and Zenk, M.H. 2001. Phosphorylation of 1-deoxy-D-xylulose by D-xylulokinase of *Escherichiacoli*, *Eur. J. Biochem.* 267, 310-316. [Sondersforschungsbereich 369, DFG, Germany]
24. Rohdich, F., Eisenreich, W., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C.A. and Bacher, A. 2001. Biosynthesis of terpenoids: 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) from *Plasmodium falciparum*, *Eur. J. Biochem.* 268, 3190-3197. [Sondersforschungsbereich 369, DFG, Germany]
25. Hecht, S., Kis, K., Eisenreich, W., Amslinger, S., Wungsintaweekul, J., Herz, S., Rohdich, F. and Bacher A. 2001. Enzyme-assisted preparation of isotope-labeled 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, *J. Org. Chem.* 66(11), 3948-3952. [Sondersforschungsbereich 369, DFG, Germany]
26. Schuhr, C., Hecht, S., Kis, K., Eisenreich, W., Wungsintaweekul, J., Bacher, A. and Rohdich, F. 2001. Studies on the non-mevalonate pathway. Preparation and properties of isotope-labeled 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate, *Eur. J. Org. Chem.* 3221-3226. [Sondersforschungsbereich 369, DFG, Germany]
27. Hecht, S., Wungsintaweekul, J., Rohdich, F., Kis, K., Radykewicz, T., Schuhr, C.A., Eisenreich, W., Richter, G. and Bacher, A. 2001. Biosynthesis of terpenoids: Efficient multistep biotransformation procedure affording isotope-labeled 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate using recombinant 2C-methyl-D-erythritol 4-phosphate synthase, *J. Org. Chem.* 66, 7770-7775. [Sondersforschungsbereich 369, DFG, Germany]
28. Fellermeier, M., Raschke, M., Sagner, S., Wungsintaweekul, J., Schuhr, C.A., Hecht, S., Radykewicz, T., Adam, P., Rohdich, F., Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D. and Zenk, M.H. 2001. Studies on the nonmevalonate pathway of terpene biosynthesis: The role of 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate in plants, *Eur. J. Biochem.* 268, 6302-6310. [Sondersforschungsbereich 369, DFG, Germany]

29. Kis, K., Wungsintaweekul, J., Eisenreich, W., Zenk, M.H. and Bacher, A. 2000. An efficient preparation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphoric acid and its derivatives, *J. org. Chem.* 65, 587-592. [Sondersforschungsbereich 369, DFG, Germany]
30. Radykewicz, T., Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A., Zenk, M.H. and Arigoni, D. 2000. Biosynthesis of terpenoids: 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Escherichia coli* is a class B dehydrogenase, *FEBS Letters* 465, 157-160. [Sondersforschungsbereich 369, DFG, Germany]
31. Lüttgen, H., Rohdich, F., Herz, S., Wungsintaweekul, J., Hecht, S., Schuhr, C.A., Fellermeier, M., Sagner, S., Zenk, M.H., Bacher, A. and Eisenreich, W. 2000. Biosynthesis of terpenoids: YchB protein of *Escherichia coli* phosphorylates the 2-hydroxy group of 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 1062-1067. [Sondersforschungsbereich 369, DFG, Germany]
32. Herz, S., Wungsintaweekul, J., Schuhr, C.A., Hecht, S., Lüttgen, H., Sagner, S., Fellermeier, M., Eisenreich, W., Zenk, M.H., Bacher, A. and Rohdich, F. 2000. Biosynthesis of terpenoids: YgbB protein converts 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol 2-phosphate to 2C-methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 2486-2490. [Sondersforschungsbereich 369, DFG, Germany]
33. Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Eisenreich, W., Richter, G., Schuhr, C.A., Hecht, S., Zenk, M.H. and Bacher, A. 2000. Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 6451-6456. [Sondersforschungsbereich 369, DFG, Germany]
34. Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Luetgen, H., Fischer, M., Eisenreich, W., Schuhr, C.A., Fellermeier, M., Schramek, N., Zenk, M.H. and Bacher, A. 2000. Biosynthesis of terpenoids: 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol kinase from tomato, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 8251-8256. [Sondersforschungsbereich 369, DFG, Germany]
35. Rohdich, F., Schuhr, C.A., Hecht, S., Herz, S., Wungsintaweekul, J., Eisenreich, W., Zenk, M.H. and Bacher, A. 2000. Biosynthesis of isoprenoids. A rapid method for the preparation of isotope-labeled 4-diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol, *J. Am. Chem. Soc.* 122, 9571-9574. [Sondersforschungsbereich 369, DFG, Germany]
36. Arigoni, A., Giner, J-L., Sagner, S., Wungsintaweekul, J., Zenk, M.H., Kis, K., Bacher, A. and Eisenreich, W. 1999. Stereochemical courses of the reduction step in the formation of 2C-

- methylethritol from the terpene precursor 1-deoxyxylulose in higher plants, Chem. Commun. 1127-1128. [Sondersforschungsbereich 369, DFG, Germany]
37. Rohdich, F., Wungsintaweeikul, J., Fellermeier, M., Sagner, S., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., Bacher, A. and Zenk, M.H. 1999. Cytidine 5'-triphosphate-dependent biosynthesis of isoprenoid: YgbP protein of *Escherichia coli* catalyzes the formation of 4-diphosphocytidyl-2-C-methylethritol, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96, 11758-11763. [Sondersforschungsbereich 369, DFG, Germany]
-

ประวัตินักวิจัย (ผู้ร่วมวิจัย)

ชื่อ

นางนัทธา แก้วนพรัตน์
MS. NATTHA KAEWNOPPARAT

ตำแหน่งปัจจุบัน

รองศาสตราจารย์
เงินเดือน 50,700.- บาท

หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้

ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม
คณะเภสัชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90112
โทรศัพท์ 074-288841
โทรสาร 074-428148



E-mail address: nuttha.s@psu.ac.th ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	สาขา	พ.ศ.	สถานศึกษา
วท.ม.	เภสัชศาสตร์	2534	มหาวิทยาลัยมหิดล
วท.บ.	เภสัชศาสตร์	2529	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา ระบุสาขาวิชา)

1. Drug delivery
2. Cosmetic sciences
3. Semisolid pharmaceutical dosage form

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่

1. Mo, J., Panichayupakaranant, P., **Kaewnopparat, N.**, Nitiruangjaras, A., Reanmongkol, W. Topical anti-inflammatory and analgesic activities of standardized pomegranate rind extract in comparison with its marker compound ellagic acid in vivo. *Journal of Ethnopharmacology* , -: DOI: 10.1016/j.jep.2013.05.040, 2013
2. Kaewnopparat S, Dangmanee N, **Kaewnopparat N**, Srichana T, Chulasiri M, Settharaksa S. In vitro probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Anaerobe*, Apr 25: doi: 10.1016/j, 2013.
3. Songkro, S., Jenboonlap, M., Boonprasertpon, M., Maneenuan, D., Bouking, K., **Kaewnopparat, N.** Effects of Glucam P-20, Vanillin and Fixolide on Mosquito Repellency of Citronella Oil Lotions. *Journal of Medical Entomology*, 49(3): 672-677, 2012.
4. Songkro, S., Hayook ,N., Jaisawang, J., Maneenuan, D., Chuchome, T., **Kaewnopparat, N.** Investigation of inclusion complexes of citronella oil,

- citronellal and citronellol with β -cyclodextrin for mosquito repellent. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 72: 339-355. 2012.
5. Reanmongkol, W., **Kaewnopparat, N.**, Ratanajamit, C Development of tramadol hydrochloride rectal gel preparations and evaluation of analgesic activity in experimental animals. *J. Drug Del. Sci. Tech.*, 21(6): 503-507, 2011.
 6. Reanmongkol, W., **Kaewnopparat, N.**, Ratanajamit, C. Physicochemical properties, *in vitro* release and *in vivo* evaluation of tramadol hydrochloride rectal suppository and rectal gel. *Asian Biomedicine*, 5(2): 269-275. 2011.
 7. Shoosanglertwijit, J., Kaewnopparat, S., Yongmaitreesakul, B., Pattayananthavej, S., **Kaewnopparat, N.** Stability studies of extemporaneous furosemide suspensions. *Asian Biomedicine*, 5(5): 681-686. 2011.
 8. Kaewnopparat, S. and **Kaewnopparat, N.** (2009) Formulation and Evaluation of Vaginal Suppositories Containing Lactobacillus. *World Academy of Science, Engineer and Technology* 2009, 55(July), 640-643.
 9. **Kaewnopparat, N.**, Kaewnopparat, S., Jangwang, A., Maneenaun, D., Chuchoe, T. and Panichayupakaranant, P. Increased Solubility, Dissolution and Physicochemical Studies of Curcumin-Polyvinylpyrrolidone K-30 Solid Dispersions. *World Academy of Science, Engineer and Technology*. 55(July), 229-234.
 10. **Kaewnopparat, N.**, Oungbho, K., Kaewnopparat, S., Rittirod, T., Rojanarat, W. and Tessiri, T. Preparation of extemporaneously diazepam suppositories: *In vitro* release and aging study. *Isan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(1): 26-34, 2006
 11. **Kaewnopparat, N.**, Kaewnopparat, S., Rojanarat, W. and Oungbho, K.. Enhanced release of diazepam from hollow-type suppositories. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 8(4): 310-312, 2004.
 12. Tantishaiyakul, V., Wiwattanawongsa, K., Pinsuwan, S., Kasiwong, S., Phadoongsombat, N., Kaewnopparat, S., **Kaewnopparat, N.** and Rojanasakul, Y. Characterization of mefenamic acid-guaiacol ester: stability and transport across Caco-2 cell monolayers. *Pharmaceutical Research*, 19(7): 1014-1019, 2002.
 13. Ingkathawornwong, S., **Kaewnopparat, N.** and Tantishaiyakul, V. Studies on aging piroxicam-polyvinylpyrrolidone solid dispersions. *Pharmazie*, 56 (3): 227-230, 2001.
 14. **Kaewnopparat, N.**, Jangwang, A., Maneenaun, D., Koosakulnakorn, L. and Pongsaurupong, S. Physical Characterization and Aging Studies of Fast

- Release Phenobarbital-Urea Solid Dispersions. Thai J. Pharm. Sci, 25(3-4): 121-132, 2001.
15. Sunthornpit, S., **Keawnopparat, N.**, Songkarak. S. and Faroongsarng, D. Evaluation of methylcellulose and carbopol solutions as viscous vehicles for ketoconazole ophthalmic suspensions. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 22(4): 435-445, 2000.
 16. Tantishaiyakul, V., **Keawnopparat, N.** and Ingkatawornwong, S. Properties of solid dispersions of piroxicam in polyvinylpyrrolidone. Int. J. Pharm., 181: 143-151, 1999.
 17. Tantishaiyakul, V., **Keawnopparat, N.** and Ingkatawornwong, S. Properties of solid dispersions of piroxicam in polyvinylpyrrolidone K-30. Int. J. Pharm., 143: 59-66, 1996.
-

ประวัตินักวิจัย (ผู้ร่วมวิจัย)



1. ชื่อ นายมาเนศ บุญยานันต์
MR. MANES BOONYANANT
2. หมายเลขประจำตัวประชาชน 3 1411 00240 27 0
3. ตำแหน่งปัจจุบัน เจ้าพนักงานป่าไม้อาวุโส
4. หน่วยงานที่สามารถติดต่อได้ ศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพสุสิรินธร
บ้านเลขที่ 9 หมู่ที่ 5 ต.บุไยยะ อ.สุโขทัย-ลก
จ.นราธิวาส 96120
โทรศัพท์ 081-8980881 098-0158395
E-mail address: prptd55@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

คุณวุฒิ	สาขา	พ.ศ.	สถานศึกษา
ประกาศนียบัตร ปริญญาตรี	วิชาการป่าไม้	2530	โรงเรียนป่าไม้แพร่
ปริญญาตรี	ส่งเสริมและสื่อสารการเกษตร	2532	สถาบันราชภัฏเพชรบุรีพิทยาลงกรณ์
ปริญญาตรี	การจัดการทรัพยากรป่าไม้ และสิ่งแวดล้อม	2556	มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช
ปริญญาโท	การจัดการพัฒนาสังคม	2543	ศิลปศาสตร์มหาบัณฑิต (นิต้า)

6. ตำแหน่งหน้าที่สำคัญที่เคยดำรงตำแหน่ง

- คณะทำงานด้านป่าไม้ฯและปฏิบัติงานประจำเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเฉลิมพระเกียรติฯ (พ.ศ. 2534–2543)
- หัวหน้างานป่าไม้ โครงการพิภูล่องฯ และปฏิบัติงานประจำเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าฯ (พ.ศ. 2542–2543)
- รักษาการในตำแหน่งหัวหน้าเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเฉลิมพระเกียรติฯ (พ.ศ. 2544 เวลา 4 เดือน)
- ทำหน้าที่หัวหน้าศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพสุสิรินธร ตั้งแต่ พ.ศ.2544 จนถึงปัจจุบัน (16 ปี 5 เดือน)

7. ผลงานดีเด่น

- ปฏิบัติหน้าที่ ณ ศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพสุสิรินธร และ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี จังหวัดนราธิวาส ซึ่งเป็นพื้นที่เสี่ยงภัยจากปัญหาความไม่สงบในพื้นที่ 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้ รวมเป็นเวลา 26 ปี
- ได้รับบรรจุเป็นกำลังพลจังหวัดนราธิวาส จำนวน 4 ครั้ง (พสร. 3,540 บาท) ซึ่งมีผลการปฏิบัติงานดีเด่น ดังนี้
- ถวายงานสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ จำนวน 4 ครั้ง (พ.ศ. 2537-2548)
- ถวายงานสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จำนวน 28 ครั้ง (พ.ศ. 2533-2556)
- ได้รับคัดเลือกเป็น “ข้าราชการพลเรือนดีเด่น” และ “ครูทองคำ” (ก.พ.) พ.ศ. 2546
- ได้รับคัดเลือกเป็นข้าราชการ “เพชรน้ำเอก” พ.ศ. 2551

- ได้รับคัดเลือกเป็น “เพชรจรัสแสง” บุคคลต้นแบบ สังกัดกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม พ.ศ. 2556
- สร้างเครือข่ายเยาวชนและประชาชนอนุรักษ์ป่าพรุโต๊ะแดง “เพื่อนชาวพรุ” เพื่อสนองงานพระราชดำริ พ.ศ. 2548-2560

8. ประสบการณ์ที่มีส่วนร่วมกับการบริหารงานวิจัยในพื้นที่ป่าพรุโต๊ะแดง

1. งานศึกษาหากล้างผลิตของไม้เสม็ดขาวในพื้นที่พรุ (ปี พ.ศ. 2539 – 2542)
 2. งานศึกษาการแตกหน่อไม้เสม็ดของไม้เสม็ดขาวที่ตัดฟันในระดับความสูงที่ต่างกันบริเวณป่าพรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส (ปี พ.ศ. 2541 – 2542)
 3. งานศึกษาการตัดสางขยายระยะที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของไม้เสม็ดขาว (ปี 2535 – 2542)
 4. งานสาธิตการจัดการป่าเสม็ดขาว (ปี พ.ศ. 2538 – 2542)
-