การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกซึ่งมีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกในสัตว์

นาง วารี นิยมธรรม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SELECTION OF LACTIC ACID PRODUCING BACTERIA FOR ANIMAL PROBIOTICS

Mrs. Waree Niyomtham

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pathobiology

Department of Veterinary Pathology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

491937

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกซึ่งมีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกในสัตว์
โดย	นาง วารี นิยมธรรม
สาขาวิชา	พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ เกรียงศักดิ์ พูนสุข
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.อรรณพ คุณาวงษ์กฤต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.อัจฉริยา ไศละสูต)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ เกรียงศักดิ์ พูนสุข)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง อินทิรา กระหม่อมทอง)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์เทพ วิไลพันธ์)

วารี นิยมธรรม : การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกซึ่งมีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกในสัตว์.
(SELECTION OF LACTIC ACID PRODUCING BACTERIA FOR ANIMAL PROBIOTICS)
อ. ที่ปรึกษา: รศ.น.สพ.เกรียงศักดิ์ พูนสุข, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, 92 หน้า.

การศึกษาวิธีการเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกซึ่งมีศักยภาพใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์ ได้ดำเนินการโดยแยกแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria) จากตัวอย่างไก่พื้นเมือง มูลสัตว์ ปลาน้ำจืด อาหารหมักดอง และผลิตภัณฑ์โปรไบโอติคจากต่างประเทศ จำนวน 30, 25, 15, 9 และ 1 ตัวอย่างตามลำดับ รวมทั้งหมด 80 ตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อตามวิธีมาตรฐาน (ISO-15214) ได้แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสิ้น 216 ไอโซเลท (isolates) จากตัวอย่าง สามารถจำแนกกลุ่มตามรูปร่างเป็นแท่ง ทรงกลมเรียงตัวเป็นสายโซ่ และทรงกลมเรียงเป็นสี่เซลล์ จำนวน 121, 63 และ 32 ไอโซเลท ตามลำดับ จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกแยกแบคทีเรียกรดแลคติคได้ 3 ไอโซเลท มีลักษณะรูปแท่ง 2 ไอโซเลท และทรงกลม 1 ไอโซเลท ทำการสุ่มเลือกแบคทีเรียกรดแลคติคที่เพาะได้ จำนวน 50 ไอโซเลท และจากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกอีก 3 ไอโซเลท รวมทั้งสิ้น 53 ไอโซเลท นำไปศึกษาเพื่อทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นที่จะนำไปใช้เป็นโปรไบโอติก ได้แก่ การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ และเคมีบำบัด การทนกรด การทนน้ำดี และคุณสมบัติในการสร้างสารต้านจุลชีพ ผลการศึกษาสามารถคัดเลือกได้แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 6 ไอโซเลท ได้แก่ C43-1, C72-1, F23-1, C70-2, C76-1 และ C80-2 ดำเนินการศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยเปรียบเทียบกับไอโซเลท Fr-A, Fr-B และ Fr-C ที่เพาะแยกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก พบว่า ทุกไอโซเลทมีความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะและเคมีบำบัดหลายชนิดที่ทดสอบ เช่น aztreonam, streptomycin, colistin, tetracycline, nalidixic acid และ vancomycin สามารถทนต่อกรดที่ pH 2.5 ทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และทุกไอโซเลทที่ทดสอบสามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ *E. coli* ATCC 25922, *Listeria innocua* DMST 9011, *Listeria monocytogenes* DMST 17303, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Salmonella* Cholerasuis ATCC 10708, *Bacillus cereus* ATCC 11778 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 แต่ไม่สร้างสารแบคเทอริโอซิน ผลจากการศึกษาความคล้ายคลึงโดยการวิเคราะห์ทางฟีโนไทป์ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียกลุ่มที่มีรูปร่างเป็นแท่ง ไอโซเลท C43-1, C72-1, F23-1, Fr-A และ Fr-B คล้ายคลึงกับ *Lactobacillus salivarius*, *L. plantarum*, *L. plantarum*, *L. casei* และ *L. plantarum* ตามลำดับ แบคทีเรียที่มีรูปร่างทรงกลม ไอโซเลท C70-2, C76-1 และ Fr-C มีความใกล้เคียงกันกับเชื้อมาตรฐาน *Enterococcus faecium*, *E. hirae* และ *E. faecium* ตามลำดับ ส่วน C80-2 ใกล้เคียงกับ *Pediococcus pentosaceus* จากการศึกษานี้ พบว่า สามารถใช้วิธีข้างต้น ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์ได้เป็นผลสำเร็จ โดยสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก 4 ไอโซเลท ได้แก่ *L. plantarum* C72-1, *L. plantarum* F23-1, *E. faecium* C70-2 และ *P. pentosaceus* C80-2 ซึ่งมีคุณสมบัติในห้องปฏิบัติการใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศ

ภาควิชาพยาธิวิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4875564931 : MAJOR PATHOBIOLOGY

KEY WORD: LACTIC ACID BACTERIA/ PROBIOTIC/ *Lactobacillus plantarum*/ *Enterococcus faecium*

WAREE NIYOMTHAM : SELECTION OF LACTIC ACID PRODUCING BACTERIA FOR ANIMAL PROBIOTICS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KRIENGSAK POONSUK, THESIS COADVISOR : ASSOC.PROF. SOMBOON TANASUPAWAT, Ph.D., 92 pp.

The studies for selection of lactic acid bacteria (LAB) that has potential for probiotics in animals were carried base on the method described in ISO-15214. The 30, 25, 15, 9 and 1 indigenous samples were taken from chickens, farm animal's feces, fresh water fishes, fermented foods and a commercial probiotic product, respectively. The results yielded 216 isolates, with different morphology; rods (121/216), cocci in chain (63/216) and tetrads (32/216). The isolates from a commercial probiotic yield, 2 rods and 1 coccus in chain. Fifty-three isolates, including 3 isolates from the commercial probiotics were randomly selected and subjected for further studies. Antimicrobial susceptibilities, acid tolerance, bile tolerance and antimicrobial activities were examined. The results revealed 6 isolates, C43-1, C72-1, F23-1, C70-2, C76-1 and C80-2 of potential probiotics bacteria and 3 commercial probiotic isolates, Fr-A, Fr-B and Fr-C. All of the potential had a wide and broad resistance to the tested antimicrobial and chemotherapeutic agents (aztreonam, streptomycin, colistin, tetracycline, nalidixic acid and vancomycin). All of the tested isolates could tolerate to acidity at pH 2.5 and 4 % bile salt solution. All of the tested isolates could inhibit *E. coli* ATCC 25922, *Listeria Innocua* DMST 9011, *Listeria monocytogenes* DMST 17303, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311, *Salmonella* Cholerasuis ATCC 10708, *Bacillus cereus* ATCC 11778 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 but did not produce bacteriocin. When comparing the phenotypic differences and 16S rDNA sequence, the rod-shaped isolates C43-1, C72-1, F23-1, Fr-A and Fr-B were similar to *Lactobacillus salivarius*, *L. plantarum*, *L. plantarum*, *L. casei* and *L. plantarum*, respectively. The cocci chain isolates C70-2, C76-1 and Fr-C were similar to *Enterococcus faecium*, *E. hirae* and *E. faecium*, respectively. The tetrad (C80-2) was similar to *Pediococcus pentosaceus*. This study described method which for the selection of potential probiotics and successfully identified 4 isolates which are *L. plantarum* C72-1, *L. Plantarum* F23-1, *E. faecium* C70-2 and *P. pentosaceus* C80-2 respectively, which had comparable in vitro probiotic activities commercial import products.

Department of Veterinary Pathology — Student's signature .....

Field of study Pathobiology — Advisor's signature .....

Academic year 2006 — Co-advisor's signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ โดยได้รับความกรุณา ความช่วยเหลือ ทั้งกำลังกาย กำลังใจและกำลังความคิดจากบุคคลมากมายจึงสำเร็จได้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ

ทุนอุดหนุนการวิจัยส่วนหนึ่งจาก โครงการภายใต้ความร่วมมือทางวิชาการระหว่างคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนาน่าน (โครงการพัฒนาจุลินทรีย์สิ่งเติมในอาหาร สำหรับปศุสัตว์ 2548-2549)

ประธานกรรมการ รศ.สพ.ญ.ดร.อัจฉริยา ไศละสูต ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.น.สพ.เกรียงศักดิ์ พูนสุข และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ความรู้ เทคนิค ข้อคิดเห็น สารเคมี เชื้อมาตรฐาน สำหรับการทดสอบ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ รศ.สพ.ญ.อินทิรา กระหม่อมทอง และผศ.ดร.พงษ์เทพ วิไลพันธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ความรู้ เทคนิค การสนับสนุน และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา และภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ความรู้

คุณนิตยา เมธาวณิชพงศ์ และคุณอำนาจ ภักดีโต ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

บิดา มารดา พี่สาว พี่ชาย คุณจิตรกร นิยมธรรม และด.ญ.ศุพิชญา นิยมธรรม ในการสนับสนุน ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่สำคัญ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ซ

สารบัญรูป ..... ฎ

สัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฐ

บทที่

1 บทนำ 1

1.1 แนวเหตุผล ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมุติฐาน 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 2

1.3 คำสำคัญ 2

1.4 คำถามสำหรับการวิจัย 2

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 2

2 ทฤษฎีหรืองานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก 3

2.2 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติก 3

2.3 การจำแนกสกุลแบคทีเรียกรดแลคติก 6

2.4 กระบวนการหมักกรดแลคติก 9

2.5 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก 13

2.6 ความหมายของโปรไบโอติก 14

2.7 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก 15

2.8 คุณสมบัติโปรไบโอติก 16

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 21

บทที่		หน้า
3	วิธีการทดลองหรือระเบียบวิธีวิจัย	25
	3.1 การแยกและคัดเลือก Lactic acid bacteria	25
	3.2 ทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติก	26
	3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก	29
	3.4 เปรียบเทียบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างกับผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากต่างประเทศ	34
4	ผลการทดลอง	35
	4.1 การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกและการทำให้บริสุทธิ์	35
	4.2 ทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติก	36
	4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก	44
	4.4 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างกับผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากต่างประเทศ	56
5	สรุปผลการวิจัย การอภิปราย และข้อเสนอแนะ	58
รายการอ้างอิง		61
ภาคผนวก		70
	ภาคผนวก ก อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	71
	ภาคผนวก ข ตารางแปลผล	74
	ภาคผนวก ค คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก	76
	ภาคผนวก ง ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก	83
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์		92

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลต่างๆ	5
2	การแบ่งกลุ่มของจีนัส *Lactobacillus*	6
3	ค่า pH ในระบบทางเดินอาหารไก่	17
4	แบคทีเรียทดสอบ (Indicator strain)	29
5	ชนิดตัวอย่าง รหัสเชื้อ และจำนวนไอโซเลท	37
6	ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติก	38
7	ผลการทดสอบอัตราการอยู่รอดของเชื้อทดสอบในสภาวะกรด pH 2.5	39
8	ผลการทดสอบคุณสมบัติการทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3, 1 และ 4 เปอร์เซนต์	40
9	ขอบเขตของการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธี agar spot	43
10	คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก	47
11	คุณสมบัติการสร้างกรดจากการใช้คาร์โบไฮเดรทของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก	48
12	ผลการวิเคราะห์ผนังเซลล์ ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก	49
13	ไอโซเมอร์ของกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก	50
14	เปอร์เซนต์ความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA ของไอโซเลท Fr-C, C70-2, C76-1 และสปีชีส์อื่น	54
15	เปอร์เซนต์ความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16 S rDNA ของไอโซเลท F23-1, C72-1, Fr-A, Fr-B, C43-1, C80-2 และสปีชีส์อื่น	55
16	การเปรียบเทียบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้	57
17	การแปลผลสำหรับการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยวิธี disc diffusion	74
18	ค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในการทดสอบคุณสมบัติการทนน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก	75
19	คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก 53 ไอโซเลท	77
20	คุณสมบัติการสร้างกรดจากการใช้คาร์โบไฮเดรทของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก 53 ไอโซเลท	80

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กระบวนการหมักแบบ Homofernentation	11
2	กระบวนการหมักแบบ Heterofernentation	12
3	การเกิดบริเวณใสในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี agar spot	42
4	ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion	42
5	ลักษณะจุลสัณฐานวิทยาและการติดสีแกรมบวกของเชื้อที่คัดเลือกจากตัวอย่าง	45
6	ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมบวกของเชื้อที่คัดเลือกจากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก	46
7	ผล Thin Layer Chromograph ของการวิเคราะห์ผนังเซลล์	49
8	Phylogenetic trees ของไอโซเลท Fr-C, C70-2 และ C76-1 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน	52
9	Phylogenetic trees ของไอโซเลท C43-2, C72-1, F23-1, C80-2, Fr-A และ Fr-B เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน	53

สัญลักษณ์และคำย่อ

ATCC	=	American Type Culture Collection, Rockville,MD,USA
cfu/ml	=	colony forming unit / milliliter
DMST	=	Department of Medical Sciences, National Institute of Health, Nonthaburi, Thailand
MRS	=	de Man, Roga sharpe
NRIC	=	NODAI Research Institute Culture Collection
OD	=	Optical density
%	=	เปอร์เซนต์
B. cereus	=	*Bacillus cereus*
E. coli	=	*Escherichia coli*
E. faecalis	=	*Enterococcus faecalis*
E. faecium	=	*Enterococcus faecium*
E. hirae	=	*Enterococcus hirae*
L casei	=	*Lactobacillus casei*
L. plantarum	=	*Lactobacillus plantarum*
L. lactis subsp.*lactis*	=	*Lactococcus lactis* subsp.*lactis*
Lc. mesenteroides	=	*Leuconostoc mesenteroides*
Ls. innocua	=	*Listeria innocua*
Ls. moncytogenes	=	*Listeria moncytogenes*
P. pentocaseus	=	*Pediococcus pentocaseus*
Ps. aeruginosa	=	*Pseudomonas aeruginosa*
S. Cholerasuis	=	*Salmonella* Cholerasuis
S. Typhimurium	=	*Salmonellla* Typhimurium
Y. enterocolitica	=	*Yersinia enterocolitica*