การคัดเลือกเชื้อ *Enterococcus faecium* ที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองที่มีศักยภาพใช้เป็นโปรไบโอติกโดยการทดสอบคุณสมบัติทางห้องปฏิบัติการ

นางนภาพร เลิศวรปรีชา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SELECTION OF POTENTIAL *ENTEROCOCCUS FAECIUM* ISOLATED FROM NATIVE CHICKEN FOR PROBIOTIC USE ACCORDING TO THE *IN VITRO* PROPERTIES

Mrs. Napaporn Lertworapreecha

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกเชื้อ *Enterococcus faecium* ที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองที่มีศักยภาพใช้เป็นโปรไบโอติกโดยการทดสอบคุณสมบัติทางห้องปฏิบัติการ
โดย	นางนภาพร เลิศวรปรีชา
สาขาวิชา	พยาธิวิทยาทางสัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ธงชัย เฉลิมชัยกิจ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ น.สพ.เกรียงศักดิ์ พูนสุข

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ธงชัย เฉลิมชัยกิจ)

.....อาจารยที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ เกรียงศักดิ์ พูนสุข)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นภาพร เลิศวรปรีชา : การคัดเลือกเชื้อ *Enterococcus faecium* ที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองที่มีศักยภาพใช้เป็นโปรไบโอติกโดยการทดสอบคุณสมบัติทางห้องปฏิบัติการ (SELECTION OF POTENTIAL *ENTEROCOCCUS FAECIUM* ISOLATED FROM NATIVE CHICKEN FOR PROBIOTIC USE ACCORDING TO THE *IN VITRO* PROPERTIES) อ. ที่ปรึกษา: รศ.น.สพ.ดร.ธงชัย เฉลิมชัยกิจ, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.น.สพ.เกรียงศักดิ์ พูนสุข, 89 หน้า

ในปัจจุบัน อุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ที่ใช้เป็นอาหารมีการใช้โปรไบโอติกอย่างแพร่หลายพอควร รวมทั้งในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ เนื่องจากโปรไบโอติกสามารถช่วยปรับความสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ เสริมสร้างสุขภาพและการเจริญเติบโตของสัตว์ แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อทำการคัดเลือกเชื้อ *Enterococcus faecium* จากทางเดินอาหารของไก่พื้นเมืองมาใช้เป็นโปรไบโอติก โดยการแยกเชื้อจากไก่พื้นเมืองจำนวน 30 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถแยกเชื้อ *E. faecium* ได้ทั้งสิ้น 60 สายพันธุ์ จากนั้นนำเชื้อมาทำการทดสอบคุณสมบัติของโปรไบโอติกในเบื้องต้นคือ การทดสอบการทนต่อกรด (pH 2) และเกลือน้ำดี ผลการทดสอบพบเชื้อ *E. faecium* จำนวน 15 สายพันธุ์ที่สามารถทนต่อกรดได้ และที่ทนได้ดี คือ EFMC 21, EFMC 17, EFMC 24, EFMD 25, EFMI 47 และ EFMI 49 ส่วนการทนต่อเกลือน้ำดี พบว่ามีจำนวน 4 สายพันธุ์ที่ทนได้นานถึง 4 ชั่วโมง คือ EFMC 21, EFMD 30, EFMI 47 และ EFMI 49 หลังจากนั้นนำเชื้อ *E. faecium* ทั้ง 15 สายพันธุ์มาทำการทดสอบความสามารถในการจับเกาะกับเยื่อเมือกของลำไส้ พบเชื้อ *E. faecium* จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ EFMI 47 และ EFMI 49 ที่สามารถจับเกาะได้ดีเมื่อเทียบกับเชื้อ *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก (EFC) ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคพบว่าเชื้อ *E. faecium* จำนวน 7 สายพันธุ์ คือ EFMC 17, EFMC 21, EFMC 24, EFMD 29, EFMD 30, EFMI 46 และ EFMI 49 ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดีเมื่อเทียบกับ EFC การทดสอบหาชนิดของสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคพบเชื้อ *E. faecium* ทุกสายพันธุ์สามารถสร้างกรดได้และมี 4 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้คือ EFMC 21, EFMD 25, EFMI 47 และ EFMI 49 เมื่อพิจารณาจากคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ *E. faecium* ทั้ง 15 สายพันธุ์ดังที่กล่าวมา สรุปได้ว่าพบเชื้อ *E. faecium* จำนวน 2 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ดีที่สุดจากการศึกษาครั้งนี้ คือ EFMI 47 และ EFMI 49 เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อกรด (pH 2) ได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นที่ทดสอบ สามารถทนต่อน้ำดีได้นานถึง 4 ชั่วโมง สามารถยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ได้ดีที่สุด สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ และสามารถสร้างกรดและแบคเทอริโอซินได้ ทั้งนี้การทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้พบว่ามีความไวรับต่อยา amoxicillin+clavulanic, ciprofloxacin, gentamycin, trimethoprim+sulphamethoxazole, vancomycin และ trimethoprim ในขณะที่ดื้อต่อยา cefotaxime, erythromycin และ tetracycline การทดสอบยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกได้ โดยใช้เทคนิค PCR และ DNA-DNA hybridization โดยผลการศึกษายืนยันว่าเชื้อที่แยกได้คือเชื้อ *E. faecium* ทั้งสองสายพันธุ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาพยาธิวิทยา
สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนิสิต นภาพร เลิศวรปรีชา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ธงชัย เฉลิมชัยกิจ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4875557531: MAJOR PATHOBIOLOGY

KEY WORD: probiotics, *Enterococcus faecium*, native chicken

NAPAPORN LERTWORAPREECHA: SELECTION OF POTENTIAL *ENTEROCOCCUS FAECIUM* ISOLATED FROM NATIVE CHICKEN FOR PROBIOTIC USE ACCORDING TO THE *IN VITRO* PROPERTIES. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. THONGCHAI CHALERMCHAIKIT, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. KRIENGSAK POONSUK, 89 pp.

Probiotics have been widely used in presented food-animal production, including poultry industries. Since the effect of enteric microbial balancing from probiotics reveals benefits of promoting health and enhancing growth rate of animals. However, most of the commercial available probiotics in Thailand have to be imported. Therefore the objective of this study was the selection of proper *Enterococcus faecium* from gastrointestinal tract of native chick to use as probiotic. Sixty strains of *E. faecium* were isolated from 30 samples of native chicken gastrointestinal tracts. All 30 strains were subjects to be tested on acid (pH 2) and bile tolerance tests. The results found 15 strains were tolerate to acid but the best were EFMC 21, EFMC 17, EFMC 24, EFMD 25, EFMI 47, and EFMI 49. Only 4 strains; EFMC 21, EFMD 30, EFMI 47, and EFMI 49; were survival after 4 hours of bile exposure. Fifteen strains of the acid tolerance were tested for their ability of intestinal mucus attachment. The result found that EFMI 47 and EFMI 49 strains were able to attach to intestinal mucus better than the commercial-imported *E. faecium* strain (EFC). The ability of pathogenic bacteria inhibition test, the result found 7 strains; EFMC 17, EFMC 21, EFMC 24, EFMD 29, EFMD 30, EFMI 46, and EFMI 49; showed better performance than strain EFC. All 7 strains were acid producers but only 4 strains; EFMC 21, EFMD 25, EFMI 47, and EFMI 49; were able to release bacteriocin. Consideration based on proper probiotic properties, 2 strains of *E. faecium* isolated from Thai native chicken in this study; labeled EFMI 47 and EFMI 49; were the potential use as probiotics. Since their better properties of acid tolerance, bile tolerance, intestinal mucus attachment, pathogenic bacterial inhibition ability, and bacteriocin producing. Antimicrobial susceptibility test of these 2 strains had been performed. They were susceptible to amoxicillin+clavulanic, ciprofloxacin, gentamicin, trimethoprim+sulphamethoxazole, vancomycin, and trimethoprim. On the other hand, they were resistant to cefotaxime, erythromycin, and tetracycline. The *E. faecium* genotypes of both isolates were confirmed by using PCR and DNA-DNA hybridization.

Department of Veterinary Pathology
Field of study Veterinary Pathobiology
Academic year 2007

Student's signature Napaporn Lertworapreecha.
Advisor's signature T. Chalermchaikit.
Co-advisor's signature Kriengsak Poonsuk

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจากคณาจารย์ รวมถึงทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ

ประธานคณะกรรมการ รศ.สพ.ญ.ดร.อัจฉริยา ไศละสูต ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ รวมถึงตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. น.สพ. ดร. ธงชัย เฉลิมชัยกิจ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รศ. น.สพ. เกรียงศักดิ์ พูนสุข ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ รวมถึงตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

รศ. ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษา ความรู้ รวมถึงเทคนิคต่างๆ

ผศ. ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ อาจารย์ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำ

โครงการภายใต้ความร่วมมือทางวิชาการระหว่างคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนาน่าน ในโครงการพัฒนาจุลินทรีย์สิ่งเติมในอาหาร สำหรับปศุสัตว์ 2548 – 2549 ที่กรุณาสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของศูนย์ติดตามการดื้อยาของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ (ภายใต้ความร่วมมือขององค์การอนามัยโลก) คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้กำลังใจตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญรูปภาพ..... ฏ

สารบัญแผนภูมิ..... ฐ

สัญลักษณ์และคำย่อ..... ฑ

บทที่

1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

1.3 คำสำคัญ..... 3

1.4 คำถามสำหรับงานวิจัย..... 3

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 คำจำกัดความของโปรไบโอติก (Definition of Probiotic) 4

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียเป็นโปรไบโอติก..... 7

2.2.1 ศึกษาการทนกรด และทนน้ำดี (acid and bile tolerance)..... 7

2.2.2 ศึกษาการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้..... 9

2.2.3 การศึกษาความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ..... 9

2.3 กลไกการทำงานของโปรไบโอติก..... 10

2.3.1 การแย่งพื้นที่ในการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้และการแย่งสารอาหาร. 11

2.3.2 สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น..... 12

2.4 ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกในอาหารสัตว์..... 18

2.5 เอนเตอโรค็อคคัส (*Enterococcus*) 19

2.6 การดื้อต่อยาต้านจุลชีพของ *Enterococcus* 22

หน้า

บทที่

2.7 *Enterococcus* ที่เป็นโปรไบโอติก..... 22
2.8 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 24
3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 26
3.1 ตัวอย่าง..... 26
3.2 การแยก *Enterococcus* 26
3.3 การตรวจสอบลักษณะเบื้องต้นของ *E. faecium*..... 27
3.4 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ..... 27
3.4.1 ทดสอบความสามารถในการทนสภาวะในระบบทางเดินอาหาร..... 27
3.4.2 ความสามารถในการยึดติดกับเยื่อเมือกลำไส้..... 28
3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของ *E. faecium* ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค... 29
3.5 การทดสอบหาชนิดของสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของ *E. faecium*..... 29
3.6 การทดสอบความไวรับของแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพ..... 31
3.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *E. faecium* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) 32
3.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *E. faecium* ด้วยเทคนิค DNA-DNA Hybridization.. 33
3.9 ขอบเขตในการคัดเลือกเชื้อ *E. faecium* เพื่อนำไปใช้เป็นโปรไบโอติก..... 36
3.10 เปรียบเทียบคุณสมบัติของเชื้อ *E. faecium* ที่คัดเลือกได้กับเชื้อ *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก..... 36
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 37
4.1 ผลการนับจำนวนและจำแนกสปีชีส์ของ *Enterococcus* จากตัวอย่างไก่พื้นเมือง 37
4.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ..... 38
4.2.1 ผลการทดสอบความสามารถในการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหาร..... 38
4.2.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยึดติดกับเยื่อเมือกลำไส้..... 42
4.2.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค..... 45

หน้า

บทที่

4.2.4 ผลการทดสอบหาชนิดของสารยับยั้งแบคทีเรียอื่น 49
4.2.5 ผลการทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ..... 50
4.2.6 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *E. faecium* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) 53
4.2.7ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *E. faecium* ด้วยเทคนิค DNA-DNA hybridization..... 54
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 55
รายการอ้างอิง..... 59
ภาคผนวก..... 67
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมีและยาต้านจุลชีพ..... 68
ภาคผนวก ข 76
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 89

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Lactic acid bacteria ที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกในมนุษย์.....	5
2	จุลินทรีย์ที่ได้รับการยอมรับว่าเป็น General Recognize as Safe (GRAS).....	6
3	ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ในระบบทางเดินอาหารของไก่.....	8
4	ชนิดของแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก lactic acid bacteria……	13
5	ชนิดของแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก lactic acid bacteria (ต่อ).....	14
6	ชนิดของแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก lactic acid bacteria (ต่อ).....	15
7	ชนิดและคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus*……..	16
8	คุณสมบัติสำคัญที่ใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus*…..	20
9	Oligodeoxynucleotide Primer.....	32
10	Total Viable Count (log_{10} CFU/gm) ของ *Enterococcus* จากตัวอย่างไก่พื้นเมือง.....	37
11	ผลการจำแนกสปีชีส์ของ *Enterococcus* จากตัวอย่างไก่พื้นเมือง.....	38
12	สายพันธุ์ของ *E. faecium* ที่สามารถอยู่รอดในระบบทางเดินอาหาร.....	39
13	อัตราการอยู่รอดของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง ในการทนต่อกรด (pH 2.0).....	40
14	ความสามารถในการทนต่อน้ำดีของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง ในเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง……	42
15	ประสิทธิภาพในการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง.....	44
16	ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง.....	47
17	ชนิดสารยับยั้งแบคทีเรียอื่นที่สร้างจาก *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง.....	50
18	ความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง.....	52
19	ความคล้ายคลึงของ DNA-DNA homology ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง.....	54
20	Total Viable Count (log_{10} CFU/gm) ของ *Enterococcus* จากตัวอย่างกระเพาะพักของไก่พื้นเมือง.....	75
21	Total Viable Count (log_{10} CFU/gm) ของ *Enterococcus* จากตัวอย่างลำไส้เล็กส่วนต้นของไก่พื้นเมือง……....	76

ตารางที่ หน้า

22 Total Viable Count (log_{10} CFU/gm) ของ *Enterococcus* จากตัวอย่างลำไส้เล็กส่วนปลายของไก่พื้นเมือง..... 77

23 คุณสมบัติของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง..... 78

24 คุณสมบัติของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง (ต่อ)..... 79

25 คุณสมบัติของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง (ต่อ)..... 80

26 คุณสมบัติของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง (ต่อ)..... 81

27 คุณสมบัติของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง (ต่อ)..... 82

28 คุณสมบัติของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง (ต่อ)..... 83

29 อัตราการอยู่รอดของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองในการทนต่อกรด (pH 2.0) ปริมาณของ *E. faecium* เริ่มต้นคือ $1.5x10^8$ CFU/mL..... 84

30 ความสามารถในการทนต่อน้ำดี (bile) ที่ 1 ชั่วโมง ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง..... 85

31 ความสามารถในการทนต่อน้ำดี (bile) ที่ 2 ชั่วโมง ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง..... 86

32 ความสามารถในการทนต่อน้ำดี (bile) ที่ 3 ชั่วโมง ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง..... 86

33 ความสามารถในการทนต่อน้ำดี (bile) ที่ 4 ชั่วโมง ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง..... 86

34 ประสิทธิภาพการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $1.5x10^8$ CFU/mL..... 87

35 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของ *E. faecium* ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง..... 88

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่		หน้า
1	การสร้าง biofilm ของแบคทีเรีย.....	11
2	Pore information ที่เกิดจากแบคเทอริโอซิน.....	18
3	Phylogenetic tree จากการเปรียบเทียบลำดับเบสในช่วง 16S rRNA ของแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus*.....	21
4	การยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ของ *E. faecium* ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง.....	43
5	Inhibition zone ของ *E. faecium* ที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองทดสอบโดยวิธี agar spot.....	46
6	PCR product ของ *E. faecium* (EFMC 21, EFMD 30, EFMI 47 และ EFMI 49) ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง.....	53

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญแผนภูมิ

สารบัญที่ หน้า

1 ประสิทธิภาพในการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง..... 45

2 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *E. coli* ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง..... 48

3 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *S.* Enteritidis ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง..... 48

4 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *S.* Typhimurium ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง..... 49

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัญลักษณ์และคำย่อ

WHO	=	*World Health Organization*
USFDA	=	The United States Food and Drug Administration
CLSI	=	Clinical and Laboratory Standards Institute
GRAS	=	Generally Recognize As Safe
ATCC	=	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA
NRIC	=	NODAI Research Institute Culture Collection, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan.
TISTR	=	Thailand Institute of Science and Technological Research, Bangkok, Thailand.
BHI agar	=	Brain-Heart Infusion agar
BHI broth	=	Brain-Heart Infusion broth
KF agar	=	Kenner faecal agar
PDS	=	Peptone Diluting Saline
PBS	=	Phosphate Buffer Solution
SDS	=	Sodium Dodecyl Sulphate ethanol
CFU/mL	=	Colony Forming Unit/milliliter
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
PBP	=	Penicillin Binding Protein
BSH	=	Bile Salt Hydrolysis
HSP	=	Heat Shock Protein
EMC	=	Extracellular Matrix Molecules
VFA	=	Volatile Fatty Acid
SAT	=	Salt Aggregation Test
LDL	=	Low Density Lipoprotein
E-tube	=	Eppendroff tube
LAB	=	*Lactic Acid Bacteria*
VRE	=	Vancomycin Resistance Enterococci
B. bifidum	=	*Bifidobacterium bifidum*
E.coli	=	*Escherichia coli*
E. avium	=	*Enterococcus avium*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E. durans	=	*Enterococcus durans*
E. faecalis	=	*Enterococcus faecalis*
E. faecium	=	*Enterococcus faecium*
E. gallinarum	=	*Enterococcus gallinarum*
L. fermentum	=	*Lactobacillus fermentum*
L. delbrueckii	=	*Lactobacillus delbrueckii*
L. reuteri	=	*Lactobacillus reuteri*
S. Enteritidis	=	*Salmonella* Enteritidis
S. Typhimurium	=	*Salmonella* Typhimurium
S. aureus	=	*Staphylococcus aureus*
R	=	Resistance
I	=	Intermediate
S	=	Susceptible
AMC	=	Amoxicillin+Clavulanic acid (20+10 ug)
AMP	=	Ampicillin (10 ug)
CTX	=	Cefotaxime (30 ug)
CIP	=	Ciprofloxacin (5 ug)
CHPC	=	Chloramphenicol (30 ug)
CN	=	Gentamycin (10 ug)
ERY	=	Erythromycin (15 ug)
SXT	=	Trimethoprim+Sulphamethoxazole (1.25+23.75 ug)
TET	=	Tetracyclin (30 ug)
VAN	=	Vancomycin (30 ug)
W	=	Trimethoprim (5 ug)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตและส่งออกสินค้าประเภทเนื้อไก่และผลิตภัณฑ์เป็นอันดับ 5 ของโลก รองจากประเทศสหรัฐอเมริกา บราซิล จีน และฝรั่งเศส นอกจากนี้ยังเป็นสินค้าส่งออกที่สามารถนำเงินตราเข้าประเทศได้มากอย่างหนึ่ง จากสถิติการส่งออกสินค้า ปศุสัตว์ในปี 2548 พบว่ามีมูลค่าการส่งออกเนื้อไก่และผลิตภัณฑ์ยังต่างประเทศสูงถึง2,174,546,121 บาท (ศูนย์ปฏิบัติการสารสนเทศกรมปศุสัตว์, 2548) นอกจากนี้การส่งออกเนื้อไก่ไปยังต่างประเทศมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ดีในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เนื้อมักพบปัญหาการติดเชื้อและไก่ตายกันมาก ในกรณีของไก่เป็นโรคจะมีการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ นอกจากนั้นแล้วยังมีการนำเอายาปฏิชีวนะหรือสารเคมีสังเคราะห์ มาผสมลงในอาหารสัตว์ เพื่อใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโต (growth promoter) และเพื่อควบคุมเชื้อโรค ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เช่นนี้มีมานานแล้ว ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาเรื่องของยาปฏิชีวนะตกค้าง พบแบคทีเรียดื้อต่อยาปฏิชีวนะมากขึ้นเรื่อยๆ พบการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคในผลิตภัณฑ์ ทำให้แบคทีเรียในฟาร์มเกิดการดื้อต่อยาโดยเฉพาะแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella* เป็นต้น ส่งผลให้การรักษาโรคนั้นยากยิ่งขึ้น และหากไม่มีการหยุดยาก่อนส่งออกจำหน่ายจะทำให้มีสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อสัตว์ และถ่ายทอดไปตามห่วงโซ่อาหาร (food chain) สู่ผู้บริโภคได้ จากปัญหาดังกล่าวองค์กรที่เกี่ยวข้องกับการคุ้มครองผู้บริโภค จึงให้ความห่วงใยและกังวลต่อสุขภาพและความปลอดภัยของผู้บริโภคเป็นอย่างมาก รวมไปถึงนานาประเทศให้ความตระหนักถึงพิษภัยและอันตราย จากสารตกค้างและการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์มากขึ้นดังจะเห็นได้จากมาตรการต่างๆ ที่ประเทศนั้นๆ กำหนดขึ้นมาเพื่อคุ้มครองประชากรในประเทศของตน เช่น กลุ่มการค้าทวิภาคีสหภาพยุโรป (EU) กำหนดมาตรฐานเพื่อความปลอดภัยทางด้านอาหาร เป็นต้น

ดังนั้นในปัจจุบันจึงเกิดทฤษฎีการเลี้ยงไก่แบบใหม่ขึ้น เป็นการเลี้ยงไก่แบบชีวภาพ โดยมีการนำเอาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกเข้ามาใช้ในระบบการเลี้ยง เพื่อเป็นการลดและทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ เนื่องจากโปรไบโอติกมีส่วนช่วยส่งเสริมความสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ ส่งผลให้สัตว์มีความต้านทานโรค เสริมการเจริญเติบโต ทำให้สัตว์มีสุขภาพดี แข็งแรง และยังกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้อีกด้วย (Fuller, 1989)

โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตที่นำมาผสมลงในอาหารหรือน้ำให้สัตว์กินโดยตรง ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยการช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย

(Fuller, 1989) จุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติก เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ อยู่ในกลุ่มที่สร้างกรดแลคติกได้ (lactic acid bacteria) ได้แก่ *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* และ *Bifidobacterium* เป็นต้น

ปัจจุบันการนำเอาจุลินทรีย์ที่มีคุณประโยชน์มาใช้เป็นโปรไบโอติกนั้น ได้มีการยอมรับกันอย่างแพร่หลาย มีการนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมทั้งในมนุษย์และสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์โปรไบโอติกมีส่วนช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโต ช่วยลดจุลินทรีย์ก่อโรคในทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังสามารถสร้างเอนไซม์ที่ร่างกายสร้างไม่ได้ เช่น เซลลูเลส (cellulase) เพคติเนส (pectinase) เป็นต้น ทำให้คนหรือสัตว์ที่บริโภคได้รับสารอาหารต่างๆ ได้มากขึ้น แบคทีเรียที่นิยมนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกมีหลายชนิด ชนิดที่มีการศึกษากันมายาวนานคือ*Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* มีการนำมาใช้เป็นส่วนผสม และใช้ในการผลิตเป็นผลิต ภัณฑ์นม เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต อย่างไรก็ตามยังมีแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมและมีการศึกษากันมากในปัจจุบันคือ *Enterococcus* เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีการทดสอบแล้วว่ามีลักษณะเด่นในด้านของการบำบัดรักษาโรคท้องร่วง และเป็นแบคทีเรียที่ทนทานต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารได้ดี (Bellomo et al.,1980) สปีชีส์ของ *Enterococcus* ที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (USFDA) รับรองว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognize As Safe, GRAS) และกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (ประเทศไทย) ได้ประกาศให้มีใช้เป็นสารเสริมชีวนะ คือ *E. faecium* สายพันธุ์ที่มีศึกษากันในช่วงแรกๆ คือสายพันธุ์ SF68 เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมที่แยกได้ในประเทศสวีเดน และสวิสเซอร์แลนด์ (Lewenstein et al., 1979) สามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ในห้องปฏิบัติการได้หลายชนิด เช่น *E. coli*, *Salmonella* spp. และ *Campylobacter* spp. (Bellomo et al., 1980)

อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่มีใช้ในประเทศไทย ส่วนใหญ่มักจะเป็นผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศ มีราคาสูง นอกจากนั้นผลลัพธ์จากการใช้โปรไบโอติกค่อนข้างจะแปรผัน ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยต่างๆ เช่น อัตราการรอดของแบคทีเรียที่ถูกผสมในผลิตภัณฑ์ สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้เป็นสายพันธุ์ต่างประเทศอาจไม่เหมาะสมกับการนำมาใช้ในบ้านเรา

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อคัดเลือก *E. faecium* จากตัวอย่างไก่พื้นเมืองมาทำการตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อในด้านต่างๆ ที่เหมาะสมเป็นโปรไบโอติกในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดเลือก *Enterococcus faecium* จากตัวอย่างไก่พื้นเมืองที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก โดยการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อในห้องปฏิบัติการ

1.3 คำสำคัญ

(ไทย) โปรไบโอติก เอนเตอโรค็อคคัส ฟีเซียม ไก่พื้นเมือง

(อังกฤษ) probiotic, *Enterococcus faecium*, native chicken

1.4 คำถามสำหรับงานวิจัย

สายพันธุ์ของ *E. faecium* ที่คัดเลือกมานั้นมีคุณสมบัติเหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกหรือไม่ โดยพิจารณาจากคุณสมบัติการเป็นโปรไบอติกในห้องปฏิบัติการ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ได้ *E. faecium* สายพันธุ์ที่มีศักยภาพสำหรับการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในอนาคต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คำจำกัดความของโปรไบโอติก (Definition of Probiotic)

โปรไบโอติก (Probiotic) ถูกกล่าวถึงเป็นครั้งแรกในรายงานการวิจัยของ Lilly และ Stillwell (1965) กล่าวไว้ว่าเป็นสารชนิดหนึ่งที่ถูกขับออกมาจากจุลินทรีย์ (microorganism) ที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง และคำจำกัดความที่นิยมอ้างอิงกันมากที่สุดคือ โปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตนำมาเติมในอาหาร ช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ของเจ้าบ้าน (host) (Fuller, 1989)

ปัจจุบันจะพบว่ามีผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกออกมาให้ใช้กันมากมาย พบได้ทั้งชนิดเม็ด ชนิดน้ำ และชนิดผงสำหรับผสมลงในอาหารสัตว์ ซึ่งในปัจจุบันวงการปศุสัตว์ เช่น ฟาร์มโค สุกร และไก่ มีการนำมาใช้กันมาก (Alder and Damassa, 1980; Pollman et al., 1980) เนื่องจากพบว่ามีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและเสริมสร้างภูมิต้านทานโรคแก่สัตว์ (Benyacoub et al., 2003) และสามารถใช้ทดแทนยาต้านจุลชีพได้

ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่สร้างกรดแลคติก (lactic acid bacteria: LAB) จากกระบวนการหมัก (fermentation) สามารถพบผลิตภัณฑ์ต่างๆ นี้ ได้ทั้งในประเทศและต่างประเทศ (Sanders and Veld, 1999) (ตารางที่ 1)

Lactic acid bacteria เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ มีทั้งรูปร่างกลมและเป็นแท่ง สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการกระบวนการหมัก (Axelsson, 1998) เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นอาศัยอยู่ตามลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ เป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ช่วยปรับสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ ช่วยย่อยอาหารโดยการสร้างเอนไซม์ต่างๆ เช่น แลคเตส (lactase) ไลเปส (lipase) เป็นต้น ทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมสารอาหารได้ง่ายและรวดเร็วยิ่งขึ้น มีส่วนช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในร่างกาย นอกจากนั้นแล้วแบคทีเรียเหล่านี้ยังสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ (enteropathogen)

แบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติกนั้นนอกจากจะเป็น lactic acid bacteria แล้ว ยังจะต้องได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (The United States Food and Drug Administration (FDA) (USFDA)) รับรองว่าเป็นแบคทีเรียที่มีการตรวจสอบโดยทั่วไปแล้วว่ามีความปลอดภัย (General Recognize As Safe: GRAS) (The

national independent regulator of pesticides and veterinary medicines, Australian Government, 2001) นอกจากนี้แล้วในประเทศไทย โดยพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ ว่าด้วยเรื่องประเภทสารเสริมชีวนะ ประกาศของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539 ได้กำหนดชนิดของจุลินทรีย์ที่อนุญาตให้นำมาใช้เป็นวัตถุสิ่งเติมในอาหารสัตว์ (ตารางที่ 2) โดยกำหนดให้เติมได้ในสัดส่วนไม่น้อยกว่า $1x10^5$ CFU (Colony Forming Unit) ต่ออาหารสัตว์ 1 กิโลกรัม (สมาคมส่งเสริมผู้ใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์, 2542)

ตารางที่ 1 Lactic acid bacteria ที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกในมนุษย์

ผลิตภัณฑ์	สายพันธุ์
Valio Dairy, Helsinki, Finland	*Lactobacillus rhamnosus* GG
Nestle, Lausanne, Switzerland	*Lactobacillus johnsonii* La1 (Lj1)
Yakult, Tokyo, Japan	*Lactobacillus casei* strain Shirota
	Bifidobacterium breve strain Yakult
Morinaga Milk Industry Co. Ltd., Zama City,Japan	*Bifidobacterium longum* BB536
Rhodia, Madison, Wisconsin, USA	*Lactobacillus acidophilus* NCFMr
Chr. Hansens, Milwaukee, Wisconsin, USA	*Lactobacillus casei* CRL 431 Gilliland (La-Mo)
BioGaia, Raleigh, North Carolina, USA	*Lactobacillus reuteri* SD2112
Probi, Lund, Sweden	*Lactobacillus plantarum* 299V
	Lactobacillus rhamnosus 271
Urex Biotech Inc., London, Ontario, Canada	*Lactobacillus fermentum*
	Lactobacillus rhamnosus
Danone, Le Plessis-Robinson, France	*Lactobacillus casei* DN014 001 (*Immunitas*)
Biocodex, Inc., Seattle, Washington, USA	*Saccharomyces boulardii*
Meiji Milk Products, Tokyo, Japan	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038
	Streptococcus thermophilus 1131
Snow Brand Milk Products, Tokyo, Japan	*Lactobacillus acidophilus* SBT-2062
	Bifidobacterium longum SBT-2928

ที่มา: Sanders และ Veld (1999)

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่ได้รับการยอมรับว่าเป็น General Recognize as Safe (GRAS)

จุลินทรีย์ที่ได้รับการยอมรับว่าเป็น General Recognize as Safe (GRAS)	
Aspergillus niger	*Lactobacillus curvatus*
A. oryzae	*L. delbruekii*
Bacillus coagulans	*L. fermentum*
B. lentus	*L. lactis*
B. lincheniformis	*L. plantarum*
B. pumilus	*L. reuterii*
B. subtilis (non-antibiotic producing strains only)	*Leuconostoc mesenteroides*
Bacteroides amulophilus	*Pediococcus acidilacticii*
B. capillosus	*P. cerevisiae*
B. ruminocola	*P. damnosus*
B. suis	*P. pentosaceus*
Bifidobacterium adolescentis	*Propionibacterium freudenreichii*
B. animalis	*P. shermanii*
B. bifidum	*Saccharomyces cerevisiae*
B. infantis	*Streptococcus cremoris*
B. longum	*S. diacetylactis*
B. thermophilum	*S. faecium*
Lactobacillus acidophilus	*S. faecium cenelle 68*
L. brevis	*S. intermedius*
L. bulgaricus	*S. lactis*
L. casei	*S. thermophilus*
L. cellpbiosus	

ที่มา: The national independent regulator of pesticides and veterinary medicines, Australian Government (2001)

ในอดีตแบคทีเรียที่มีการศึกษาและใช้กันมายาวนานคือแบคทีเรียในกลุ่ม lactobacilli และ bifidobacteria พบว่านำมาผลิตเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์นม เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต ที่มีขายในท้องตลาด อย่างไรก็ตามยังมีแบคทีเรียอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยม และมีการศึกษากันมากในปัจจุบัน คือแบคทีเรียกลุ่ม enterococci ซึ่งจัดเป็น lactic acid bacteria และได้รับการรับรองว่าเป็น GRAS เช่นกัน

อย่างไรก็ตาม enterococci บางสปีชีส์ก็ถือได้ว่าเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) เช่น *E. faecalis* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคหลายชนิด ได้แก่ โรคติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infections) ติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือด (bacteraemia) และโรคเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (infective endocarditis) อย่างไรก็ตามพบว่าการเกิดโรคนั้นมีความสัมพันธุ์กับ *E. faecalis* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Paulsen, 2004)

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียเป็นโปรไบโอติก

ในการค้นหาหรือการคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ๆ มาใช้เป็นโปรไบโอติกนั้นสิ่งที่ต้องทำการทดสอบประการแรกคือ การศึกษาการทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร การทนต่อน้ำดีในลำไส้ เนื่องจากเป็นการแสดงให้เห็นถึงความสามารถของแบคทีเรียที่จะอยู่รอดได้และสามารถผ่านกระเพาะอาหารของสัตว์ได้ การศึกษาต่อมาคือการศึกษาการยึดติดกับเยื่อเมือก ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญมากอีกประการหนึ่ง เนื่องจากจะแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสามารถที่จะ colonize ในลำไส้ ไม่ถูกขับออกจากร่างกาย สามารถที่จะสร้างประโยชน์ให้กับร่างกายได้ การ ศึกษารองลงมาคือการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอื่น ชนิดของสารยับยั้งที่แบค ทีเรียสร้างขึ้น ศึกษารูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพ สายพันธุ์ที่นำมาศึกษาต้องเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมจากสิ่งมีชีวิตนั้นๆ (Klaenhammer, 1993; FAO/W. H. O., 2001) นอกจากนั้นสายพันธุ์ของแบคทีเรียจะต้องมีการระบุไว้แล้วในประกาศของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ประกาศให้ใช้เป็นสารเสริมชีวนะ (ตารางที่ 2) และมีการรับรองไว้แล้วว่ามีความปลอดภัย (GRAS)

2.2.1 การศึกษาการทนกรด และทนน้ำดี (acid and bile tolerance)

ในกระเพาะอาหารของสัตว์ปีกนั้นพบว่ามีความเป็นกรดสูงมากซึ่งเคยมีรายงานว่าในกระเพาะอาหารของไก่และเป็ดมีค่า pH เท่ากับ 0.5 – 2.0 (Ehrmann et al., 2002) ใน ขณะที่ Sturkie (1976) รายงานว่าระบบบางเดินอาหารของไก่ มีค่าความเป็นกรดที่แตกต่างกันในแต่ละส่วน ซึ่งพบได้ตั้งแต่ค่าความเป็นกรดมาก (pH 2.5) จนถึงค่าความเป็นด่างมาก (pH 8.4) (ตารางที่ 3) ดังนั้นการศึกษาคุณสมบัติของการทนต่อกรดของแบคทีเรีย จะแสดงถึงความ สามารถของแบคทีเรียในการอยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหาร นอกจากปัจจัยในเรื่องการทนต่อกรดแล้วยังมีปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่ง ที่มีเกี่ยวข้องมากคือระยะเวลาที่อาหารผ่านเข้าสู่ทาง เดินอาหาร สำหรับไก่พบว่าระยะเวลาที่อาหารผ่านตลอดทางเดินอาหาร ใช้เวลาประมาณ 3 – 4 ชั่วโมง (Jin et al., 1998)

ตารางที่ 3 ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ในระบบทางเดินอาหารของไก่

ระบบทางเดินอาหาร	pH
Crop	4.00 – 6.30
Proventiculus	3.17 – 4.80
Gizzard	2.50 – 4.74
Duodenum	5.70 – 6.00
Jejunum	5.80 – 5.90
Ileum	6.30 – 6.40
Rectum or colon	6.30 – 6.40
Ceca	5.70 – 8.40
Cloaca	5.40 – 8.40

ที่มา: Sturkie (1976)

การศึกษาคุณสมบัติการทนต่อน้ำดี แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสามารถที่จะทนอยู่ได้ในลำไส้ เนื่องจากน้ำดีมีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียได้ นอกจากนั้นน้ำดียังมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยการย่อยสลายไขมันและกรดไขมันต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์เกิดเป็นช่องว่างทำให้ความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร (permeability) สูญเสียไป (Jin et al., 1998)

สำหรับการศึกษาการทนต่อกรดและการทนต่อน้ำดีนั้น ได้ทำการศึกษาแยกกัน โดยการศึกษาการทนต่อกรดของแบคทีเรียที่ pH 0.5, 1, 2, 3 และ 4 และระยะเวลานาน 1 – 2 ชั่วโมง (Jin et al., 1998) แต่การศึกษาในช่วงหลังนี้พบว่ามักจะเป็นการศึกษาที่ทำพร้อมกันทีเดียว เช่น ในการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียโปรไบโอติกสำหรับมนุษย์ จะให้แบคทีเรียได้สัมผัสกับกรด pH 3 นาน 1 – 2 ชั่วโมง จากนั้นให้แบคทีเรียสัมผัสกับน้ำดี นาน 1 – 2 ชั่วโมง (Agus, 2003) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ดัดแปลงตามวิธีการดังกล่าวเนื่องจากจะได้ทราบปริมาณคงเหลือของแบคทีเรียที่แท้จริง

Sturkie (1976) ได้รายงานไว้ว่าในระบบทางเดินอาหารของไก่นั้น มีค่าความเป็นกรดสูงสุด pH 2.5 ที่บริเวณ gizzard แต่อย่างไรก็ตามสำหรับการศึกษาครั้งนี้ เลือกการทดสอบกับกรดที่ pH 2 เนื่องจากเคยมีรายงานว่าเมื่อร่างกายต้องการอาหารค่าความเป็นกรดจะลดลง (McDonald et al., 1990) สำหรับระยะเวลาที่ใช้นาน 1 ชั่วโมง และให้แบคทีเรียสัมผัสกับน้ำดีนานถึง 4 ชั่วโมง (Jin et al., 1998)

2.2.2 ศึกษาการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้

ในระบบทางเดินอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณลำไส้ มีสภาพเป็น dynamic environment มีการย่อย ทำลาย และขับของเสีย รวมถึงแบคทีเรียด้วย การศึกษาการยึดติดของแบคทีเรียกับเยื่อเมือกผนังลำไส้นั้น เป็นการบ่งบอกถึงประสิทธิภาพการยึดติดและ colonization ในลำไส้ได้

กลไกของการยึดติดของแบคทีเรียต่อ Intestinal mucosa นั้นแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือการยึดติดแบบไม่จำเพาะ (non-specific) ได้แก่ แบบใช้แรงวาลเดอวาลส์ (Van-der-Waal's force) แบบใช้ประจุ (charge) ปฏิกิริยาการชอบน้ำ (hydrophobic interaction) และการยึดติดด้วยปฏิกิริยาไอออน (cation interaction) สำหรับการยึดติดแบบจำเพาะ (specific) เป็นการยึดติดที่มีความจำเพาะกันของ receptor กับ ligand ซึ่งมักจะพบในแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่นเชื้อ *S.* Typhimurium 798 จะใช้ type 1 fimbriae (pilli) ในการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ของหมู (Althouse et al., 2003) สำหรับการยึดติดของแบคทีเรียในกลุ่ม enterococci กับเยื่อเมือกผนังลำไส้นั้น พบว่าเป็นแบบไม่จำเพาะ สามารถพบได้ทั้งแบบ Van-der-Waal's force และแบบ hydrophobic interaction (Agus, 2003)

สำหรับวิธีการในการทดสอบการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ ของแบคทีเรียที่จะนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกนั้นจะมีอยู่ด้วยกัน 2 แบบใหญ่ๆ คือ การทดสอบกับเยื่อเมือกผนังลำไส้โดยตรง และการทดสอบกับ cell line ชนิด epithelial cell สำหรับการทดสอบแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับมนุษย์ส่วนใหญ่แล้วจะทำการทดสอบกับ cell line ชนิด epithelial cell (Human Hep-2 cell line, HT-29 MTX cell line และ Caco2 cell line) (Agus, 2003) เนื่องจากในมนุษย์ไม่สามารถขูดเอาเยื่อเมือกผนังลำไส้ได้ แต่อย่างไรก็ตามมีความพยายามที่จะแยก epithelial cell จากอุจจาระมาใช้เช่นกัน แต่ไม่ค่อยได้รับความนิยมเนื่องจากมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียสูง สำหรับการทดสอบแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับสัตว์นั้นมักจะทำการทดสอบกับ intestinal mucus โดยตรง เนื่องจากในสัตว์เองไม่มี cell line ที่จะใช้เป็นตัวแทนที่ดีในการทดสอบการยึดติดได้ นอกจากนั้นการแยก intestinal mucus จากลำไส้สัตว์สามารถทำได้ง่าย ดังนั้นในการทดสอบครั้งนี้จึงทำการทดสอบกับ intestinal mucus โดยตรง ซึ่งวิธีการได้ดัดแปลงจาก Ehrmann และคณะ (2002)

2.2.3 การศึกษาความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ

ในส่วนของการศึกษาความไวรับต่อยาต้านจุลชีพนั้น ได้ถูกระบุไว้ว่าให้มีการตรวจสอบเพื่อเป็นการศึกษารูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรีย ใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจที่จะเลือกแบคทีเรียมาใช้เป็นโปรไบโอติก อย่างไรก็ตามยังมีข้อถกเถียงกันอยู่มากว่าในการเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกนั้น ควรเลือกแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพ

หรือเลือกแบคทีเรียที่มีความไวต่อยาต้านจุลชีพดี ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของการนำเอาโปรไบโอติกนั้นไปใช้ประโยชน์

สำหรับการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียในกลุ่ม lactobacilli พบว่าเชื้อไม่สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาให้กับแบคทีเรียกลุ่มอื่นได้ (Saarela et al., 2000) ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่ม lactobacilli มาใช้เป็นโปรไบโอติก จึงมักจะเลือกสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา สำหรับแบคทีเรียในกลุ่ม enterococci นั้นเป็นแบคทีเรียที่สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาให้กับแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกันและแบคทีเรียใกล้เคียงได้ เช่น แบคทีเรียกลุ่ม enterococci ที่ดื้อต่อยาแวนโคไมซิน (Vancomycin Resistance Enterococci: VRE) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงคัดเลือกเอา สายพันธุ์ของ enterococci ที่มีความไวต่อยาต้านจุลชีพหลายชนิด เพื่อลดการถ่ายทอดยีนดื้อยาของแบคทีเรียในลำไส้ และยังเป็นการลดโอกาสการถ่ายทอดยีนดื้อยาออกสู่สิ่งแวดล้อม

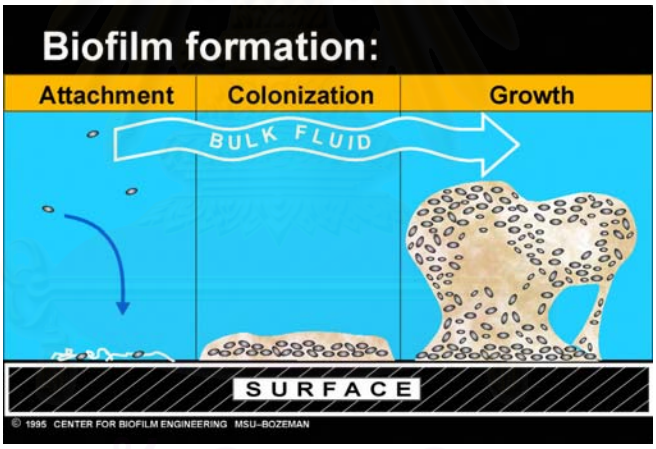
2.3 กลไกการทำงานของโปรไบโอติก

เชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารนั้นจะประกอบไปด้วยแบคทีเรีย 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ lactic acid bacteria ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เป็นมิตร และแบคทีเรียก่อโรค โดยแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้จะอยู่กันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) เกิดเป็นภาวะสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้เรียกว่า eubiosis แบคทีเรียที่เป็นมิตรส่วนใหญ่นั้นพบว่าเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น lactobacilli และ bifidobacteria ซึ่งมีปริมาณมากถึง 85% ของแบคทีเรียทั้งหมด เป็นเกราะป้องกันชั้นแรกต่อการรุกราน (invasion) ของแบคทีเรียก่อโรค แต่อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่ทำให้ความสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้สูญเสียไป เช่น อาหาร ภูมิอากาศ อายุ การใช้ยาปฏิชีวนะ ป่วย ความเครียด และพฤติกรรมการดำรงชีวิต เป็นต้น ดังนั้นจุดประสงค์ในการเติมโปรไบโอติกลงในอาหารสำหรับสัตว์ จึงเป็นการเพิ่มหรือเสริมแบคทีเรียที่เป็นมิตรเหล่านี้กลับ คืนสู่ร่างกาย เพื่อเป็นการรักษาความสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ และป้องกันการรุกรานของแบคทีเรียก่อโรค

Fuller (1989) ได้กล่าวไว้ว่า แบคทีเรียโปรไบโอติกสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ด้วยกลไกสำคัญ 2 ประการ คือ การแย่งพื้นที่ในการยึดติด (competitive adhesion site) กับ intestinal mucosa และการแย่งสารอาหารต่างๆ (competitive nutrient) เนื่องจากการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของเชื้อ ทำให้แบคทีเรียโปรไบโอติกเจริญครอบคลุมผิวเยื่อบุผนังลำไส้ นอกจากนั้นแล้วแบคทีเรียโปรไบโอติกยังสามารถสร้างสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย (anti-bacteria compounds) ได้แก่ กรดอินทรีย์ (organic acid) แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (Franz et al., 1999) เป็นต้น

2.3.1 การแย่งพื้นที่ในการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้และการแย่งสารอาหาร

การแย่งพื้นที่ในการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ และการแย่งสารอาหารเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นพร้อมกัน ดังที่กล่าวมาข้างต้นว่าแบคทีเรียในสกุล enterococci นั้นจะยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ แบบไม่จำเพาะซึ่งจะเกิดได้ง่ายกว่าการยึดติดแบบจำเพาะ ซึ่งจะมีความแตกต่างกันไปในแบคทีเรียแต่ละเสตรน ดังนั้นเมื่อแบคทีเรียในสกุล enterococci ที่มีความ สามารถทนต่อกรดและน้ำดีได้ ผ่านเข้าไปสู่ลำไส้แบคทีเรียจะยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ โดยอาศัย Van-der-Waal's force และแบบ hydrophobic interaction (Agus, 2003) แบคทีเรียสามารถที่จะ colonize บริเวณลำไส้ได้ จากนั้นแบคทีเรียจะสร้าง biofilm แผ่ขยายปกคลุมผิวเยื่อบุ (รูปภาพที่ 1) ซึ่งรูปแบบของ biofilm นี้ถือว่าเป็นเกราะป้องกันด่านแรกของการยึดติดของแบคทีเรียก่อโรคต่อผิวเยื่อบุเป็นผลให้แบคทีเรียก่อโรคที่ไม่สามารถยึดติดกับ intestinal mucus นั้นถูกกำจัดออกจากร่างกายได้ง่าย นอกจากนั้นยังป้องกันสารเคมีต่างๆ ที่สามารถทำอันตรายต่อเซลล์เยื่อบุและป้องกันตัวแบคทีเรียจาก phagocytic uptake และ non-immune antibacterial serum factor ยาต้านจุลชีพและ antibody ต่างๆ เป็นต้น



รูปภาพที่ 1 การสร้าง biofilm ของแบคทีเรีย
ที่มา: Misty (2006) (http://www.uweb.engr.washington.edu/research/tutorials/biofilm.)

นอกจากนั้นการเพิ่มปริมาณมากขึ้นของแบคทีเรียจะส่งผลให้เกิดการแก่งแย่งสารอาหารต่างๆ อีกด้วย นอกจากปัจจัยดังกล่าวแล้วยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องอีก กล่าวคือ ในระหว่างที่แบคทีเรียเจริญจะมีการสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่น ได้แก่ กรดอินทรีย์ (organic acid) แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นต้น (Franz et al., 1999) เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

2.3.2 สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น

แบคทีเรียโปรไบโอติกยังสามารถสร้างสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียอื่น ได้แก่ กรดอินทรีย์ (organic acid) แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

2.3.2.1 กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียโปรไบโอติกสร้างออกมานั้นประกอบอยู่ด้วย กรดแลคติก และ กรดไขมัน (volatile fatty acids: VFA) ได้แก่ กรดอะซิติก (acetic) กรดโพรพิโอนิก (propionic) และ กรดบูไทริก (butyric) กรดทั้งสองประเภทนี้มีปริมาณที่แตกต่างกันไปในแต่ละส่วนของระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal tract) (Lindsey, 1990) ในระบบทางเดินอาหารของไก่นั้นจะพบปริมาณของกรดแลคติกสูงมากที่บริเวณ crop รองลงมาเป็น ileum และ cecaในขณะที่กรดไขมัน (VFA) จะมีปริมาณสูงที่ ceca รองลงมาเป็น ileum และ crop ตามลำดับอย่างไรก็ตามปริมาณของกรดที่แบคทีเรียโปรไบโอติกสร้างออกมานั้น ส่งผลให้ระบบทางเดินอาหารมีความเป็นกรดสูง (pH 2 – 3) (Carina et al., 2000) ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งเจริญของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *E. coli, Salmonella* Pullorum และ *Campylobacter* spp. เป็นต้น

2.3.2.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นอนุมูลอิสระที่ได้จากกระบวนการหายใจของสิ่งมีชีวิต โดยการใช้ออกซิเจน (O_2) เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายได้เป็นซุปเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) เมื่อทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจน (H) จะได้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารนี้เป็นพิษต่อโครงสร้างและการทำงานของเซลล์ กล่าวคือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะดึงอิเล็กตรอนจากอะตอมไฮโดรเจนของโมเลกุลอื่นๆ ที่อยู่ใกล้เคียง เช่น ไขมัน โปรตีน เป็นต้น ทำให้โครงสร้างของโมเลกุลเกิดการเปลี่ยนแปลงไป ไม่สามารถทำงานได้

แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียบางชนิดสามารถป้องกันตัวเองจากสารพิษดังกล่าวได้ โดยการสร้างเอนไซม์ catalase เพื่อทำการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ lactic acid bacteria จะสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่ใช้ออกซิเจน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นได้ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างมาจาก *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้ (Ocaña et al., 1999)

Naaber และคณะ (2004) ทำการศึกษาการยับยั้ง *Clostridium difficile* โดย *Lactobacillus paracasei* และ *L. plantarum* ที่แยกได้จากลำไส้ พบว่าผลของการยับยั้งดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับ H_2O_2 และกรดแลคติกที่เชื้อสร้างขึ้น

Strus และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* (*L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* และ *L. acidophilus*) ที่มีคุณสมบัติ

เป็นโปรไบโอติกต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Candida albecans* และ *C. pseudotropicalis* ในห้องปฏิบัติการ พบว่าผลของการยับยั้งนั้นเกิดจาก H_2O_2

2.3.2.3 แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เป็นสารประกอบโปรตีน (proteinaceous compound) ที่สร้างจากแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียจะสร้างในช่วง log phase แบคเทอริโอซินจัดเป็นสารต่อต้านจุลชีพ (antimicrobial substance) หรือมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่น แบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินพบได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ สำหรับ lactic acid bacteria ที่สร้างแบคเทอริโอซินได้นั้นมีหลายสปีชีส์ (Parada et al., 2007) (ตารางที่ 4 – 6) โดย เฉพาะอย่างยิ่ง *Lactobacillus*, *Pediococcus* และ *Enterococcus*

ตารางที่ 4 ชนิดของแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก lactic acid bacteria

Producing species	Bacteriocin	Spectrum of action
Lactococcus lactis subsp. *Lactis*	Nisin	Gram positive bacteria
	Lacticin 3147	*Clostridium* sp.
		Listeria monocytogenes
		Staphylococcus aureus
		Streptococcus dysgalactiae
		Enterococcus faecalis
		Propionibacterium acne
		Streptococcus mutans
Lactococcus lactis subsp. *Cremoris*	Lactococcin B	*Lactobacillus*
Lactobacillus acidophilus	Acidocin CH5	Gram-positive bacteria
		Lactobacillus
	Lactacin F	*Lactobacillus fermentum*
		Enterococcus faecalis
		Lactobacillus delbrueckii
		Lactobacillus helveticus
Lactobacillus amylovorus	Lactobin A	*Lactobacillus acidophilus*
		Lactobacillus delbrueckii

ที่มา Parada และคณะ (2007)

ตารางที่ 5 ชนิดของแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก lactic acid bacteria (ต่อ)

Producing species	Bacteriocin	Spectrum of action
Lactobacillus casei	Lactocin 705	*Listeria monocytogenes*
		Lactobacillus plantarum
Leuconostoc gelidum	Leucocin A	*Lactobacillus*
		Enterococcus faecalis
		Listeria monocytogenes
Leuconostoc mesenteroides	Mesentericin Y105	*Enterococcus faecalis*
		Listeria monocytogenes
Pediococcus acidilactici	Pediocin F	Gram-positive bacteria
	Pediocin PA-1	*Listeria monocytogenes*
	Pediocin AcH	Gram-positive and Gram-negative bacteria under stressing situations
Pediococus pentosaceous	Pediocin A	*Lactobacillus*
		Lactococcus
		Leuconostoc
		Pediococcus
		Staphylococcus
		Enterococcus
		Listeria
		Clostridium
Lactobacillus casei	Lactocin 705	*Listeria monocytogenes*
		Lactobacillus plantarum
Leuconostoc gelidum	Leucocin A	*Lactobacillus*
		Enterococcus faecalis
		Listeria monocytogenes
Lactobacillus sake	Lactocin S	*Lactobacillus*
		Leuconostoc
		Pediococcus

ที่มา Parada และคณะ (2007)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ชนิดของแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก lactic acid bacteria (ต่อ)

Producing species	Bacteriocin	Spectrum of action
Enterococcus faecium	Enterocin A	*Listeria monocytogenes*
		Pediococcus
Lactobacillus sake	Lactocin S	*Lactobacillus*
		Leuconostoc
		Pediococcus
	Sakacin P	*Listeria monocytogenes*
Lactobacillus curvatus	Curvacin A	*Listeria monocytogenes*
		Enterococcus faecalis
Lactobacillus helveticus	Helveticin J	*Lactobacillus bulgaricus*
		Lactococcus lactis

ที่มา Parada และคณะ (2007)

แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus* นั้นมีชื่อเรียกว่า enterocin มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้หลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ รายงานการศึกษาพบว่า *E. faecium* RJ16 สร้าง enterocin AS-48 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (Samir et al., 2005) และ *S.* Pullorum ได้ (Carina et al., 2000) แบคทีเรียในสกุล *Enterococcus* ที่สร้าง แบคเทอริโอซินได้มีหลายสปีชีส์ (Nes et al., 2007) (ตารางที่ 7) เช่น *E. mundtii*, *E. faecalis* และ *E. faecium* เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ชนิดและคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus*

Organism	Bacteriocin	Type	Mass (Da) (amino acids)
E. faecalis	Cytolysin Cyl_L, Cyl_S	Class I two peptide lantibiotics	3,458 (38), 2,032 (21)
E. faecium	Enterocin A	Class Iia pediocin-like	4,829 (47)
E. faecium	Enterocin P	Class Iia pediocin-like	4,493 (44)
E. faecium	Bac 32	Class Iia pediocin-like	7,998 (70)
E. faecium	Bacteriocin GM-1	Class Iia pediocin-like	4,630 (44)
E. faecalis	Bac 31	Class Iia pediocin-like	(43)
E. mundtii	Mundticin ATO6, mundticin KS, enterocin CRL35, mundticin QU2	Class Iia pediocin-like	4,287 (43)
E. faecalis	Enterocin SE-K4	Class Iia pediocin-like	5,356.2 (43)
E. faecium	Bacteriocin T8	Class Iia pediocin-like	5,090 (44)
E. faecium	Enterocin B	Class II (no subclass)	5,479 (53)
E. faecalis	Enterocin 1071A, enterocin 1071B	Class Iib two-peptide bacteriocin	4,285 (39), 3,897 (35)
E. faecalis	MR10A MR10B	Class Iic, leaderless	5,202 (44), 5,208 (43)
E. faecium	Enterocin L50; L50A, L50B	Class Iic, leaderless	5,190 (44), 5,178 (43)
E. faecium	Enterocin Q	Class Iic, leaderless	3,980 (34)
E. faecalis	Enterocin EJ97	Class Iic, leaderless	5,328 (44)
E. faecium	Enterocin RJ-11	Class Iic, leaderless	5,049 (44)
E. faecalis	AS-48	Class Iid circular bacteriocin	7,166 (70)

ที่มา Nes และคณะ (2007)

แบคเทอริโอซิน แบ่งได้เป็น 4 คลาส ตามคุณสมบัติทางชีวเคมี ฤทธิ์ในการยับยั้ง และลักษณะทางพันธุกรรม (Klaenhammer, 1993)

1. Class I มีขนาดน้อยกว่า 5 Kda ประกอบด้วยกรดอะมิโน lanthionine และ β-nethyl lanthionine เป็นองค์ประกอบหลัก แบคเทอริโอซินในคลาสนี้ได้แก่ nisin, lacticin 481, carnocin U149 และ lactocin S เป็นต้น

2. Class II มีขนาดน้อยกว่า 10 Kda เป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนได้ (heat-stable) ถึง 100 – 121 องศาเซลเซียส ประกอบด้วยกรดอะมิโน nonlanthionine แบคเทอริโอซินในคลาสนี้จะประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ น้อยกว่าส่วนที่ไม่ชอบน้ำ โครงสร้างเป็น β-sheet ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อยดังนี้

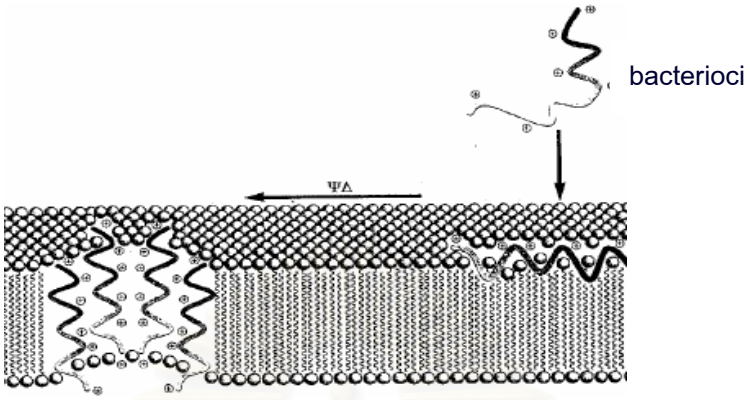
- IIa ได้แก่ pediocin PA-1, sakacin P, leucocin A และ curvacin A เป็นต้น
- IIb ได้แก่ lactococcin C, lactococcin M และ lactacin F
- IIc ได้แก่ lactococcin B

3. Class III มีขนาดมากกว่า 30 Kda เป็นโปรตีนที่ไม่ทนต่อความร้อน (heat-labile proteins) ได้แก่ helveticin J, helveticin V-1829, acidophilucin A และ lactacins A ,B

4. Class IV เป็นแบคเทอริโอซินที่ประกอบกับสารอื่น (bacteriocin complex) เช่น คาร์โบไฮเดรต หรือไขมัน จึงจะออกฤทธิ์ได้ แบคเทอริโอซินในคลาสนี้ได้แก่ plantaricin S, leuconocin S, lactocin 27 และ pediocin SJ-1

กลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินเป็นการทำงานที่มีผลต่อผนังเซลล์โดยตรง กล่าวคือ แบคเทอริโอซินจะเข้าไปแทรกตามผนังเซลล์ทำให้ผนังเซลล์เกิดเป็นช่องว่าง (รูปภาพที่ 2) ทำให้เกิดการไหลออกของสารภายในเซลล์ ทำให้สูญเสีย proton motive force (PMF) เกิดการย่อยเซลล์ และโมเลกุลต่างๆ เสียสภาพ เช่น DNA, RNA, ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน DNA, RNA และ peptidoglycan เป็นต้น (Driessen et al., 1995)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปภาพที่ 2 Pore information ที่เกิดจากแบคเทอริโอซิน
ที่มา Driessen และคณะ (1995)

2.4 ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกในอาหารสัตว์

ประโยชน์และผลลัพธ์ของการใช้โปรไบโอติกในอาหารสัตว์ สามารถสรุปได้ดังนี้ (เยาวมาลย์และสาโรจน์, 2535)

1. ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์เลี้ยงในฟาร์ม
2. ควบคุมจุลินทรีย์ ที่ทำให้เกิดโรคโดยเฉพาะในระบบทางเดินอาหารและในขณะเดียวกันยังช่วยกระตุ้นให้สัตว์สร้างภูมิคุ้มกันโรคได้
3. ช่วยทำให้การใช้น้ำตาลแลคโตสในนมเกิดได้ดีขึ้น โดยไปเพิ่มน้ำย่อยพวกเบต้ากา แลคโตซิเดส (β-galactosidase) ให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น ทำให้สัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนมโดยเฉพาะสัตว์อ่อนสามารถนำน้ำตาลจากนมไปใช้ประโยนช์ได้ดีและเพิ่มขึ้น
4. ลดการเกิดการท้องผูก
5. มีปฏิกิริยาในการลด หรือยับยั้งเนื้องอก (antitumor activities) โดยไปยับยั้งการสร้างเซลล์เนื้องอกหรือไปควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการหลั่งสารก่อมะเร็ง (carcinogens) หรือไปทำลายสารก่อมะเร็ง เช่น สารไนโตรซามีน (nitrosamines) หรือไปลดการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างสารไนโตรซามีน

จากรายงานการศึกษาของ McConnell และ Tannock (1991) พบว่าระดับของ azoreductase ลดลงถึง 31% ในหนูที่บริโภค *L. delbrueckii* และ *L. fermemtum* นอกจากนี้ Marteau และคณะ (1990) ทำการทดลองให้อาสาสมัครที่บริโภคอาหารหมัก ที่มีส่วนผสมของ *L. acidophilus* และ *B. bifidum* พบว่าระดับของ β-glucuronidase และ azoreductase ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในขณะที่ nitroreductase นั้นลดลง

จากรายงานการศึกษาของ Burns และ Rowland (2000) พบว่า LAB สามารถที่จะจับเกาะ (bind) และดูดซึม (absorption) สารก่อมะเร็งได้ นอกจากนั้นแล้วยังสามารถลดเอนไซม์ β-glucuronidase, β-galactosidase, mitroreductase รวมไปถึง azoreductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยส่งเสริมการก่อมะเร็งในกระเพาะอาหาร

6. มีผลในการยับยั้งการสร้างคอเลสเทอรอล (cholesterol) ในร่างกายได้ โดยทำให้คอเลสเทอรอล ในกระแสเลือดลดลง แบคทีเรียโปรไบโอติกสามารถลดระดับของคอเลสเทอ รอลในกระแสเลือดได้ โดยแบคทีเรียโปรไบโอติกสร้าง bile salt hydrolase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายคอเลสเทอรอลออกจากโมเลกุลอื่นๆ เกิดเป็นคอเลสเทอรอลอิสระที่สามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ จากรายงานผลการศึกษาพบว่า *L. acidophilus* สามารถที่จะเคลื่อนย้าย (remove) สารคอ เลสเทอรอลออกจากอาหารเพาะเลี้ยงได้ (Gilliland et al., 1985) และจากการศึกษาโดยให้หนูที่เป็น hyperlipidaemic บริโภค *L. reuteri* ติดต่อกัน 7 วัน พบว่าสามารถลดคอเลสเทอรอลและไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ได้ถึง 38% และ 40% ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบว่าระดับ low density lipoprotein (LDL) ยังลดลงถึง 20% (Taranto et al., 1998) ในขณะเดียวกันการให้หนูที่เป็น hypocholesterolemic บริโภคโปรไบโอติกที่มีส่วนผสมของ *E. faecium* CX และ *L. acidophilus* N5 พบว่าสามารถที่จะลดระดับคอเลสเทอรอลในเลือดของหนูทดลองเพศเมียได้ 16.9% และในหนูทดลองเพศผู้ได้ 7.8% (Zacconi et al., 1992)

2.5 เอนเตอโรค็อคคัส (*Enterococcus*)

Enterococcus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก จัดเป็น lactic acid bactria มีรูปร่างกลม (cocci) ไม่สร้างสปอร์ อยู่เป็นคู่ (pair) หรือเป็นสาย (chain) เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในบรรยากาศที่มีออกซิเจนหรือไม่มีออกซิเจนก็ได้ (facultative anaerobe bacteria) แต่ดั้งเดิม *Enterococcus* ถูกจัดว่าเป็น enteric gram positive cocci ที่อยู่ในสกุล *Streptococcus* หลังจากนั้นในช่วงปี 1930s ได้มีการจำแนกใหม่โดยการอาศัย Lancefield serological typing system จึงถูกจัดให้เป็น Group D Streptococci ต่อมาได้ทำการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมโดยการ ศึกษา DNA–DNA hybridization และจากข้อมูลการจัดลำดับ (sequencing) ของยีน 16S rRNA แสดงให้เห็นว่า *Streptococcus faecium* และ *S. faecalis* ได้ถูกแยกออกจากแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* และได้จัดให้เป็นสกุลใหม่ คือ *Enterococcus* (Schleifer and Kilpper-Ba¨ lz, 1984) คำว่า *Enterococcus* มาจากคำภาษาฝรั่งเศสว่า *enterocoque* ซึ่งบ่งบอกชัดเจนว่าแบคทีเรียนี้อาศัยอยู่ในลำไส้ *Enterococcus* เป็นเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ในระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal tract) ของคนและสัตว์ แบคทีเรียในสกุล *Enterococcus* โดยเฉพาะ *E. faecium* มีการนำมาใช้เติมลงในอาหารสำหรับมนุษย์ เช่น การทำเนยแข็ง การทำไส้กรอก และผลิตเป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกสำหรับสัตว์อีกด้วย (Franz et al., 2003)

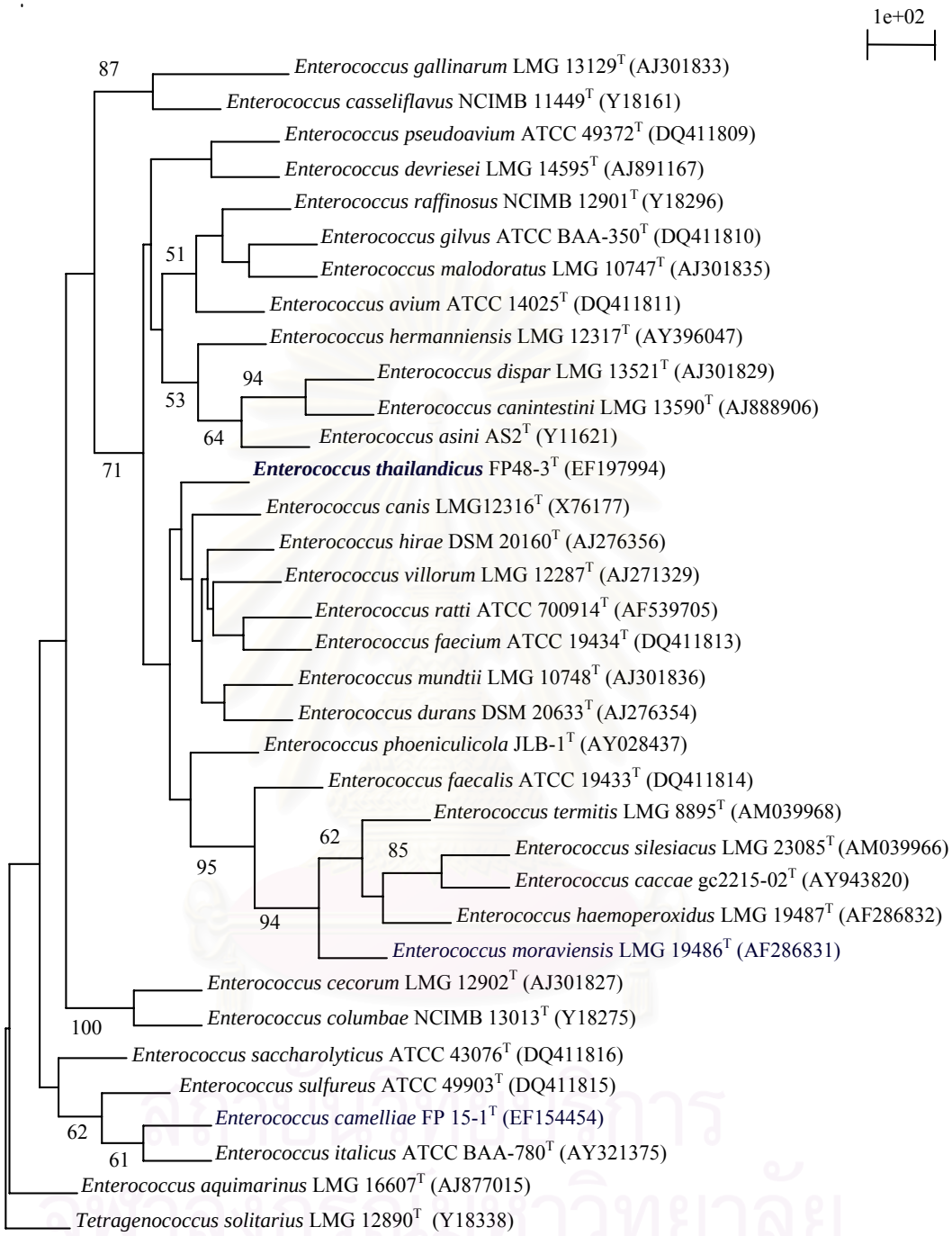
คุณสมบัติสำคัญที่ใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus* แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 คุณสมบัติสำคัญที่ใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus*[a] (Peter et al., 1986)

Characteristics	*E. avium*	*E. durans*	*E. faecalis*	*E. faecium*	*E. gallinarum*
Growth at 45°C	+	+	+	+	+
Growth in 6.5% NaCl	+	+	+	+	+
Arginine hydrolysis	-	+	+	+	+
Acid from					
Arabinose	+	-	-	+	-
Lactose	+	+	+	+	+
Mannitol	+	(-)	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-	+
Sorbitol	+	-	(+)	+	-
sucrose	+	-	-	+	+

[a] Symbols: +, 90% or more strains are positive; (+), 80-89% of strains are positive; -, 90% or more of strains are negative; (-), 11 -20% of strains are positive

ในปัจจุบันแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus* จำแนกได้เป็น 34 สปีชีส์ ตามลักษณะของ 16S rRNA sequencing (รูปภาพที่ 3) ดังนี้ *Enterococcus aquimarinus*, *E. casseliflavus*, *E. pseudoavium*, *E. devriesei*, *E. raffinosus*, *E. gilvus*, *E. malodoratus*, *E. avium*, *E. hermanniensis*, *E. dispar*, *E. canintestini*, *E. asini*, *E. thailandicus*, *E. canis*, *E. hirae*, *E. villorum*, *E. ratti*, *E. faecium*, *E. mandtii*, *E. durans*, *E. phoeniculicola*, *E. faecalis*, *E. termites*, *E. silesiacus*, *E. caccae*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. saccharolyticus*, *E. sulfurous*, *E. camelliae*, *E. italicus* และ *E. aquimatinus* (Euazeby, 2006; Švec et al., 2006; Sukontasing et al., 2007; Tanasupawat et al., 2008)



รูปภาพที่ 3 Phylogenetic tree จากการเปรียบเทียบลำดับเบสในช่วง 16S rRNA ของแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus* (Tanasupawat et al., 2008)

2.6 การดื้อต่อยาต้านจุลชีพของ *Enterococcus*

การดื้อต่อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus* พบได้ใน 2 ลักษณะ คือ การดื้อต่อยาต้านจุลชีพโดยธรรมชาติของแบคทีเรียเอง (intrinsic resistance) และการดื้อต่อยาต้านจุลชีพภายหลัง (acquired resistance) (Klare et al., 2003)

2.6.2 Intrinisic resistance

Intrinisic resistant คือรูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียโดยธรรม ชาติของตัวแบคทีเรียเอง ได้แก่ ยาในกลุ่ม cephalosporins, monobactam เช่น aztreonam กลุ่ม anti-staphylococcal penicillins เช่น cloxacillin เป็นต้น

2.6.3 Acquired resistance

Acquired resistance คือรูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียที่เกิดขึ้นภายหลังจากที่แบคทีเรียสัมผัสกับยาต้านจุลชีพ อาจจะโดยตรงหรือทางอ้อม เช่น การดื้อต่อยา penicillin กลไกหลักของ *Enterococcus* ที่ดื้อต่อยา penicillin พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ penicillin binding protein (PBP) กลไกรองคือแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ beta-lactamase มาทำลายยา การดื้อต่อยาในกลุ่ม aminoglycosides เกิดจากการสร้างเอนไซม์ aminoglycoside modifying การดื้อต่อยา vancomycin เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของยีนที่ใช้กำหนดการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียตรงตำแหน่งที่ vancomycin ไปจับจาก D-alanyl-D-alanine เปลี่ยนไปเป็น D-alanyl-D-lactate ทำให้ยา vancomycin นั้นไม่สามารถไปยับยั้งการสร้าง peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ phenotypes ที่สำคัญ ได้แก่ Van A, Van B, Van C แต่ในภายหลังพบว่ามี Van D, Van E, Van G เพิ่มขึ้น

2.7 *Enterococcus* ที่เป็นโปรไบโอติก

ได้มีการนำเอาแบคทีเรีย *Enterococcus* มาใช้เป็นโปรไบโอติกทั้งในคนและสัตว์มานาน สปีชีส์หนึ่งที่มีการศึกษากันมากและได้นำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในคนคือ *E. faecium* SF 68 มีการนำไปใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกในประเทศ Switzerland (Cylactin® LBC SF68 ME10, F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland) พบว่ามีบทบาทสำคัญต่อการป้อง กันและรักษาโรคท้องร่วงในคน (Wunderlich et al., 1989; Bellomo et al., 1980) นอก จากนั้นยังเคยมีการทดสอบว่า *E. faecium* สายพันธุ์ SF 68 สามารถรักษาโรคท้องร่วงแบบเฉียบพลัน (acute diarrhea) โดยให้ *E. faecium* SF 68 ในช่วง 1 – 3 วันแรกช่วยให้ผู้ป่วยฟื้นตัวได้เร็วขึ้นถึง >95% ภายใน 6 วัน (Buydens and Debeuckelaere, 1996)

E. faecium สายพันธุ์ SF 68 นี้มีการศึกษาพบว่ามีการนำมาใช้เป็น feed probiotic โดยมีการนำมาใช้ผสมในอาหารสุนัข พบว่าสามารถกระตุ้น cell-mediated และ humoral immune functions ในสุนัขได้อย่างมีนัยสำคัญ (Benyacoub et al., 2003)

หลังจากนั้นได้เริ่มมีการศึกษาเพื่อค้นหา *E. faecium* สายพันธุ์ต่างๆ ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบติก ทั้งในห้องปฏิบัติการและสัตว์ทดลอง นอกจากนั้นยังมีการศึกษาบทบาทร่วมกันของ *E. faecium* กับ lactic acid bacteria สปีชีส์อื่นๆ เช่น Rossi และคณะ (1999) ได้มีการนำเอา *E. faecium* CRL 183 ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก เติมลงในน้ำนมถั่วเหลืองหมัก ร่วมกับ *L. jugurti* พบว่าสามารถลดคอเลสเทอรอลในห้องปฏิบัติการได้ถึง 43%.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.8 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Garriga และคณะ (1998) ได้ทำการคัดเลือก lactic acid bacteria จากกระเพาะและลำไส้ของไก่เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับไก่ จากการศึกษาพบว่าได้ lactic acid bacteria ทั้งสิ้น 296 สายพันธุ์ พบ 77 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้ง *S.* Enteritidis และ *E. coli* ได้ จากนั้นทำการเลือกมาเพียง 8 สายพันธุ์ ที่เป็น *L. salivarius* มาทำการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกใน *in vitro* พบว่า *L. salivarius* ทั้ง 8 สายพันธุ์ สามารถยึดติดกับ intestinal mucus และมีความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ monensin สามารถทน bile salts และกรด pH 3.0 ได้ จากนั้นทำการเลือกมา 2 สายพันธุ์ ที่สามารถ colonized ในระบบทางเดินอาหารของไก่ได้ดีที่สุด คือ *L. salivarius* สายพันธุ์ CTC2183 และสายพันธุ์ CTC2197 มาทำการเปรียบเทียบความสามารถ colonized ซึ่งได้ทำการศึกษาใน *in vivo* โดยเสริม *L. salivarius* ทั้งสองสายพันธุ์ลงในอาหารสำหรับไก่ พบว่า *L. salivarius* สายพันธุ์ CTC2197 สามารถ colonized ใน crop และ caecum ของไก่ได้ดีกว่า *L. salivarius* สายพันธุ์ CTC2183

Tuomola และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาบทบาทของโปรไบโอติกแบคทีเรียต่อการยึดติดของแบคทีเรียก่อโรค (*E.coli* และ *S.* Typhimurium) ใน intestinal mucus ของคน ผลการทดสอบพบว่า *Lactobacillus GG*, *L. rhamnosus* LC-705 และ *L. rhamnosus* สามารถลดการยึดติดของ *E. coli* กับ intestinal mucus ของคนได้ และ *L. johnsonii* LJ1 และ *L. casei* Shirota สามารถยับยั้งการยึดติดของ *S.* Typhimurium ได้

Audisio และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษา *E. faecium* J96 ที่แยกได้จากไก่สุขภาพดี มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก ต่อการป้องกันการรุกรานของ *S.* Pullorum ในไก่ทั้ง *in vitro* และ *in vivo* จากการศึกษา *in vitro* พบว่า *E. faecium* J96 สามารถยับยั้ง *S.* Pullorum ซึ่งผลการยับยั้งเกิดจากกรดแลคติก และแบคเทอริโอซิน ที่สร้างจาก *E. faecium* J96 จากการศึกษา *in vivo* พบว่าการให้ *E. faecium* J96 สามารถที่จะป้องกันการรุกรานของ *S.* Pullorum ได้ แต่ไม่สามารถนำไปใช้ในเชิงของการรักษาได้

Strompfová และคณะ (2004) ได้ทำการคัดเลือก enteroocci มาใช้เป็นโปรไบโอติกในหมู โดยทำการทดสอบคุณสมบัติทางห้องปฏิบัติการดังนี้ ความไวรับต่อยาปฏิชีวนะ การสร้างแบคเทอริโอซิน การทนต่อกรด และน้ำดี การยึดติดต่อ canine mucus จากการศึกษาพบว่า *E. faecium* ทุกสายพันธุ์นั้นมีความไวรับต่อยา vancomycin, ampicillin, penicillin และ chloramphenicol สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ถึง 7 สายพันธุ์ โดยสามารถสร้างแบคเทอริโอซิน ทนต่อกรด pH 3 และทนต่อน้ำดี สามารถยึดติดกับ canine mucus ได้ดีกว่า human mucus สายพันธุ์ ที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ดีที่สุดคือ *E. faecalis* EE4 และ *E. faecium* EF01

Marciñáková และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาหาแบคทีเรียจากหญ้าหมักเพื่อทำการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก ประกอบด้วย การทนต่อกรดและน้ำดี การยึดติดกับ intestinal mucus การตรวจหาแบคเทอริโอซิน และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และศึกษารูปแบบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ คณะผู้วิจัยคาดหวังว่าจะนำแบคทีเรียไปผสมในหญ้าหมักเพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ปน เปื้อนในหญ้าหมัก ผลการศึกษานี้พบ *Enterococcus faecium* (EF9296) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีปริมาณมากที่สุดที่ทำการแยกได้ คุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติกของ *E. faecium* EF9296 พบว่า สามารถทนต่อกรดและน้ำดีได้ มีประสิทธิภาพการยึดติดกับ intestinal mucus ของทั้งคนและสุนัข สร้างกรดแลคติกได้ สร้างแบคเทอริโอซินได้ (enterocin A) สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ในการศึกษานี้คือ *Listeria monocytogenes* มีความไวรับต่อยา ampicillin, erythromycin, tetracycline, rifampicin, vancomycin ในขณะที่ดื้อต่อยา kanamycin

Boonkumklao และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการทนกรดและน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกสปีชีส์ใหม่ (*Lactobacillus thermotolerans*) ที่แยกได้จากมูลไก่ โดยทำการศึกษาใน *in vitro* ซึ่งในการศึกษานี้สามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลไก่จำนวน 5 สายพันธุ์ เป็น *Lactobacillus thermotolerans* ทั้งสิ้น จากนั้นนำมาศึกษาเกี่ยวกับการทนต่อกรดและน้ำดีโดยทำการเลี้ยง *L. thermotolerans* ทั้ง 5 สายพันธุ์ ในสภาวะแตกต่างกันดังนี้คือ เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปกติใช้เป็นหลอดควบคุม, อาหารเหลว MRS ปรับ pH 3.0, อาหาร MRS ที่เติม 0.3% (w/v) oxgall และอาหาร MRS ที่เติม 7 mM sodium taurocholate แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไร้อากาศ ผลการทดสอบพบว่าเชื้อ *L. thermotolerans* ทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถทนกรดได้ในอาหารเหลว MRS ปรับ pH 3.0 ได้นาน 4 ชั่วโมง ในขณะที่ทุกเสตรนมีการเจริญลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับหลอดควบคุม โดยพบว่า *L. thermotolerans* JCM11427 มีการเจริญได้ดีที่สุดแต่พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนั้นยังพบ ว่า sodium taurocholate ความเข้มข้น 7 mM ไม่มีผลต่อการเจริญของ *L. thermotolerans*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกหา *E. faecium* เป็นตัวอย่างกระเพาะพัก (crop) ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) และลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) ของไก่พื้นเมืองสุขภาพดี คละเพศ คละอายุ จำนวนทั้งสิ้น 30 ตัว จากพื้นที่ต่างๆ ของจังหวัดน่าน ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดเป็นตัวอย่างที่ได้จากโครงการการพัฒนาจุลินทรีย์สิ่งเติมในอาหารสำหรับปศุสัตว์ ปี 2548 ภายใต้โครงการความร่วม มือระหว่างคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราช มงคลล้านนา วิทยาเขตน่าน

นอกจากนี้ มีตัวอย่างผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกของต่างประเทศจำนวน 1 ตัวอย่าง สำหรับแยก *E. faecium* เพื่อการศึกษาเปรียบเทียบ

3.2 การแยก *Enterococcus*

การแยก *Enterococcus* จากตัวอย่างไก่พื้นเมืองโดยใช้ selective medium ซึ่งวิธีการทดสอบได้ดัดแปลงจาก Jin และคณะ (2000) โดยชั่งตัวอย่างกระเพาะพัก ลำไส้เล็กส่วนต้นและลำไส้เล็กส่วนปลายให้ได้ 25 กรัม แล้วแยกส่วนใส่ลงในถุงพลาสติกเฉพาะสำหรับ stomacher (เครื่อง stomacher รุ่น MASTICATOR ผลิตโดยบริษัท IUL instrument ประเทศสเปน) แล้วเติม PDS (Peptone Diluting Saline) ให้ได้สัดส่วนการเจือจางครั้งแรก (Initial dilution) 1:10 (ISO 6887-1, 1999) แล้วทำการตีบด แล้วนำสารละลายตัวอย่างมาทำการเจือจางต่อ (Serial dilution) โดยดูดสารละลายของตัวอย่างจำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับ PDS ให้ได้อัตราส่วน 1:10 จะได้ความเจือจางที่ 10^{-1} จากนั้นทำการเจือจางต่อจนถึงระดับความเจือจางที่ 10^{-8} ดูดสารละ ลายตัวอย่างของเชื้อที่ระดับการเจือจาง 10^{-6} – 10^{-8} ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Kenner faecal (KF) agar ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยม (drigalsky spectular) เกลี่ยให้ทั่ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที จากนั้นทำการบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

นำโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะบน KF agar มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain-Heart Infusion (BHI) agar บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บ stock ของเชื้อ โดยการนำโคโลนีของเชื้อที่ได้มาละลายในอาหาร Triptic soya broth ที่มีส่วนผสมของ glycerol 20% แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำออก มาใช้ศึกษาทดลองต่อไป

3.3 การตรวจสอบลักษณะเบื้องต้นของ *E. faecium*

การตรวจสอบลักษณะเบื้องต้นของ *E. faecium* ดัดแปลงจาก Peter และคณะ (1986) โดยการทดสอบคุณสมบัติที่สำคัญ ประกอบด้วย การย้อมสีแกรมส์ ทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase ความสามารถในการเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และความสามารถในการเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่มีส่วนผสมของเกลือ (NaCl) ระดับความเข้มข้น 6.5% ทดสอบ arginine hydrolysis การทดสอบการสร้างกรดจาก sucrose, mannitol, arabinose, raffinose, sorbitol และ lactose

3.4 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ

3.4.1 ทดสอบความสามารถในการทนสภาวะในระบบทางเดินอาหาร

กระบวนการย่อยและดูดซึมสารอาหารที่สมบูรณ์ทั้งในมนุษย์และสัตว์ จะเกิดขึ้นในบริเวณกระเพาะอาหารและลำไส้ ซึ่งในกระเพาะอาหารนั้นจะมีสภาวะความเป็นกรดสูง (pH 2)โดยส่วนใหญ่แล้ว ในกระบวนการย่อยอาหารที่บริเวณกระเพาะอาหารจะใช้เวลาประมาณ 1 - 2ชั่วโมง จากนั้นอาหารจะเคลื่อนเข้าสู่ลำไส้ ซึ่งจะเกิดกระบวนการย่อยและดูดซึมอาหารเช่นกันดังนั้นการทดลองในส่วนนี้จึงทำการจำลองสภาวะแวดล้อมจริง ซึ่งดัดแปลงจาก Agus (2003) โดยนำเอา *E. faecium* ที่คัดเลือกได้มาใช้ในการทดลอง โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบกับ
E. faecium ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อใน BHI broth ที่ปรับระดับ pH ด้วย 1 N HCl ให้ได้ pH 2 บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติมสารละลายของ Bile salt เข้มข้น 10% ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร และ Bicarbonate buffer ปริมาตร 5.1 มิลลิลิตร นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 - 4 ชั่วโมง

ทำการตรวจสอบแบคทีเรียที่สามารถอยู่รอดได้ โดยการนับจำนวนแบคทีเรียในทุกชั่วโมง โดยทำการเจือจางความเข้มข้นของแบคทีเรีย แล้วดูดตัวอย่างแบคทีเรียในแต่ละความเข้มข้น 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ KF agar ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยให้ทั่วจานเพาะเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ KF agar และนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาอัตราการอยู่รอดของแบคทีเรีย (Agus, 2003)

$$\text{อัตราการอยู่รอดของแบคทีเรีย (\%)} = \frac{\text{ปริมาณแบคทีเรียที่เหลืออยู่ (CFU/mL)} \times 100}{\text{ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น (CFU/mL)}}$$

รูปแบบการศึกษาความสามารถในการอยู่รอดได้ในสภาวะที่เป็นกรดนั้น ได้ทำการแบ่งความสามารถในการทนกรดออกเป็น 4 ระดับ คือ ระดับที่ไม่ทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหาร (อัตราการอยู่รอดได้ <50%) ทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารน้อย (อัตราการอยู่รอดได้ 50-75%) ทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารระดับปานกลาง (อัตราการอยู่รอดได้ 75-90%) และทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารมาก (อัตราการอยู่รอดได้ >90%) แต่สำหรับการศึกษาความสามารถในการอยู่รอดได้ในน้ำดีนั้น ใช้ระยะเวลาในการสัมผัสกับน้ำดีเป็นเกณฑ์ เนื่องจากปริมาณตั้งต้นของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่ทำการทดสอบนั้นแตกต่างกัน เพราะเป็นผลสืบเนื่องจากการทดสอบการทนต่อกรด

3.4.2 ความสามารถในการยึดติดกับเยื่อเมือกลำไส้

การศึกษาความสามารถในการยึดติด (adhesion) ของแบคทีเรียต่อเยื่อเมือกลำ ไส้ (intestinal mucus) เป็นการแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการยึดติดได้ในลำไส้ การศึกษาครั้งนี้ได้ดัดแปลงจาก Ehrmann และคณะ (2002) โดยเปรียบเทียบกับเชื้อ *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก

การเตรียม Intestinal mucus โดยใช้ spatular ขูดเอา mucus จากลำไส้ของไก่อายุ 45 วัน ละลายในสารละลาย phosphate buffer solution (PBS) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปปั่นแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อทำการแยกเอาส่วนของแบคทีเรียปนเปื้อน จากนั้นปั่นแยกซ้ำอีกครั้งเพื่อทำการตกตะกอน mucus ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำเอาตะกอนที่ได้มาเติม PBS แล้วนำไป lyophilized แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเตรียม mucus solution และเคลือบ mucus solution ใน Eppendroff tube (E-tube) โดยชั่ง mucus ให้ได้ 0.01 กรัม ละลายใน 50 mM Na_2CO_3 buffer (pH 9.7) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงใน E-tube ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เติมสารละลายของแบคทีเรีย ($1.5x10^8$ CFU/mL) ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างแบคทีเรียที่ไม่ยึดติดออกด้วยสารละลาย PBS ที่เติม Tween 20 (0.05%) 3 ครั้ง แล้วทำการล้างแบคทีเรียที่ยึดติดมาทำการเจือจาง (dilution) และนับจำนวน (count) แบคทีเรียที่ยึดติด และนำมาแทนค่าในสูตร (Ehrmann et al., 2002)

$$\text{ประสิทธิภาพในการยึดติดได้ของแบคทีเรีย (\%)} = \frac{\text{ปริมาณแบคทีเรียที่ยึดติดได้ (CFU/mL)} \times 100}{\text{ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น (CFU/mL)}}$$

3.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของ *E. faecium* ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

การทดสอบประสิทธิภาพของ *E. faecium* ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในห้องปฏิบัติการได้ ซึ่งมีแนวโน้วว่าถ้านำไปใช้เป็นโปรไบโอติกจริงในอนาคต แบคทีเรียคัดเลือกน่าจะสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ได้เช่นกัน สำหรับแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ *E. coli*, *Salmonella* Enteritidis และ *S.* Typhimurium เนื่องจากมีรายงานพบว่าเป็นแบคทีเรียก่อโรคกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบที่สำคัญในไก่ ซึ่งในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในครั้งนี้ได้ดัดแปลงจาก Schillinger และ Lücke (1989) โดยเปรียบเทียบกับ *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก

ทำการเพาะเลี้ยง *E. faecium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นใช้ไปเปตดูดสารละลายของแบคทีเรีย (suspension) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยอดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS soft agar ที่มีส่วนผสมของแบคทีเรียก่อโรค ปริมาณ 1.5 x 10^7 CFU/mL นำไปบ่มเพาะไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตรวจสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของเชื้อทดสอบ โดยสังเกตโซนใส (Inhibition zone) รอบๆ โคโลนีของแบคทีเรียคัดเลือก

3.5 การทดสอบหาชนิดของสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของ *E. faecium*

หลังจากที่ทำการทดสอบว่า *E. faecium* สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้จริง จากนั้นจะทำการตรวจสอบหาชนิดของสารยับยั้งที่ *E. faecium* สร้างออกมา ซึ่งสามารถคาดเดาได้ว่าการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคนั้นเป็นผลมาจากกรด แบคเทอริโอซิน หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ทดสอบในครั้งนี้ทำการเลือก *S.* Typhimurium เป็นตัวแทนของแบคทีเรียก่อโรค สำหรับวิธีการทดสอบได้ดัดแปลงจาก Ketkaew และคณะ (2005) โดยเปรียบเทียบกับเชื้อ *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก

3.5.1 การทดสอบหากรด

การเตรียมส่วนใส (suspension) โดยเพาะเลี้ยง *E. faecium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth บ่มเพาะไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใส มากรองด้วยกระดาษกรอง (filter membrane) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรู (pore-size) เท่ากับ 2 ไมโครเมตร การปรับสภาพของส่วนใส โดยนำส่วนใสมาเติม proteinaseK ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มก./มล.

เพื่อทำลายแบคเทอริโอซิน และ catalase ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 1 มก./มล. เพื่อสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จากนั้นแบ่งส่วนใสออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกนำมาปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 1 N NaOH และส่วนที่ 2 ไม่ต้องปรับ pH จากนั้นนำส่วนใสทั้งสองไปทดสอบกรดด้วยเทคนิค well diffusion assay

เทคนิค well diffusion assay ทำโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS soft agar ที่มีส่วนผสมของ *S.* Typhimurium (1.5 x10^6 CFU/ml) ทำการเจาะรูให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 ไมโครเมตร หยดส่วนใสที่เตรียมไว้ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มเพาะไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

แปลผลโดยวัดความกว้างของโซนใสรอบๆ สารละลายของแบคทีเรียในแต่ละหลุม แล้วเปรียบเทียบโซนใสในส่วนใสที่ปรับ pH และไม่ได้ปรับ pH ถ้าส่วนใสที่ปรับ pH มีความกว้างของโซนใส น้อยกว่าสารละลายของเชื้อที่ไม่ได้ปรับ pH แสดงว่าการยับยั้งแบคทีเรียเป็นผลของกรด

3.5.2 การทดสอบหาแบคเทอริโอซิน

เตรียมส่วนใสเช่นเดียวกับข้อ 3.5.1

การปรับสภาพส่วนใส โดยนำส่วนใสมาเติม catalase ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มก./มล. เพื่อสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 1 N NaOH แล้วแบ่งส่วนใสออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกนำมาเติม proteinaseK ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มก./มล. ส่วนที่ 2 ไม่ต้องเติม proteinaseK จากนั้นนำส่วนใสทั้งสองไปทดสอบหาแบคเทอริโอซินด้วยเทคนิค well diffusion assay

การแปลผลโดยวัดความกว้างของโซนใสรอบๆ ส่วนใสในแต่ละหลุม แล้วเปรียบเทียบส่วนใสที่เติม proteinaseK และไม่ได้เติม proteinaseK ถ้าส่วนใสที่การเติม proteinaseK ให้ความกว้างของโซนใสน้อยกว่า ส่วนใสที่ไม่ได้เติม proteinaseK แสดงว่าการยับยั้งแบคทีเรียเป็นผลของแบคเทอริโอซิน

3.5.3 การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เตรียมส่วนใสเช่นเดียวกับข้อ 3.5.1

การปรับสภาพส่วนใส โดยนำส่วนในมาเติม proteinaseK ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มก./มล. และปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 1 N NaOH แล้วแบ่งส่วนใสออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกนำมาเติม catalase ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มก./มล. เพื่อเป็นการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และส่วนที่ 2 ไม่ต้องเติม catalase จากนั้นนำส่วนใสทั้งสองไปทดสอบหาไฮเดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยเทคนิค well diffusion assay

การแปลผลโดยวัดความกว้างของโซนใสรอบๆ ส่วนใสในแต่ละหลุม แล้วเปรียบเทียบสารละลายของเชื้อที่เติม catalase และไม่ได้เติม catalase ถ้าส่วนใสที่การเติม catalase ให้ความกว้างของโซนใสน้อยกว่า ส่วนใสที่ไม่ได้เติม catalase แสดงว่าการยับยั้งแบคทีเรียเป็นผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

3.6 การทดสอบความไวรับของแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพ

การทดสอบความไวรับของแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพ โดยใช้วิธี Disk Diffusion Technique (Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI, 2007) การทดสอบความไวรับของแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพ เป็นการศึกษารูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรีย เนื่องจากการดื้อต่อยาปฏิชีวนะชนิดใด นั่นอาจหมายถึงแบคทีเรียมียีนดื้อต่อยาหรือมีกลไกต้านจุลชีพชนิดนั้นๆ ซึ่งแบคทีเรียอาจจะถ่ายทอดยีนดื้อยาให้กับแบคทีเรียชนิดอื่น ทำให้แบคทีเรียที่ได้รับยีนดื้อยาเกิดการดื้อยาตามไปด้วย สำหรับยาต้านจุลชีพที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้ประกอบ ด้วย amoxicillin+clavulanic acid (20+10 ug), ampicillin (10ug), cefotaxime (30 ug), ciprofloxacin (5 ug), chloramphenicol (30 ug), gentamycin (10 ug), erythromycin (15 ug), trimethoprim+sulphamethoxazole (1.25+23.75 ug), tetracyclin (30 ug), vancomycin (30 ug) และ trimethoprim (5 ug)

ทดสอบโดยทำการปรับความขุ่นแบคทีเรีย ในสารละลายเกลือ 0.85 % ให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland (1.5×10^8 CFU/mL) ใช้ไม่พันก้านสำลีจุ่มสารละลายของแบคทีเรียนำมาป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA agar จากนั้นวางทับด้วยแผ่นยาต้านจุลชีพให้ห่างกันพอสมควรนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

อ่านผลการทดสอบความไวรับของแบคทีเรีย โดยวัดขนาดของโซนใสรอบๆ แผ่นยาต้านจุลชีพ นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานของ CLSI โดยมีเชื้อ *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 29213 และ *E. coli* ATCC 25922 เป็นแบคทีเรียมาตรฐาน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *E. faecium* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ทำการตรวจสอบยืนยันสปีชีส์ของ *E. faecium* ที่ได้ โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งดัดแปลงจาก Kariyama และคณะ (2000) โดยได้ใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อยีน 16S rRNA และยีน *E. faecium* ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 Oligodeoxynucleotide Primer

Primer specificity	Size of PCR product (bp)	Primer pair sequences (5' to 3')
E. faecium	638	+ TGAGGCAGACCAGATTGACG
		- TATGACAGCGACTCCGATTCC
rrs (16S rRNA)	320	+ GGATTAGATACCCTGGTAGTCC
		- TCGTTGCGGGACTTAACCCAAC

ที่มา Kariyama และคณะ (2000)

การเตรียม DNA โดยทำการเพาะเลี้ยง *E. faecium* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโคโลนีของ *E. faecium* จำนวน 1 – 2 โคโลนี ใส่ลงในสารละลาย 0.05 M Tris hydrochloride (pH 8.0) และ 0.01 M EDTA ปริมาตร 100ไมโครลิตร ให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

การเตรียม PCR master mix โดยมีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

- *E. faecium* forward primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- *E. faecium* reward primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- rrs (16S rRNA) forward primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- rrs (16S rRNA) reward primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- 10X buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร
- แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl) 25 mM ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร
- dNTPs 10 mM ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร
- Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.125 ไมโครลิตร
- ตัวอย่าง DNA ที่ต้องการตรวจหา ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร
- น้ำ (เกรด HPLC) ปริมาตร 13.875 ไมโครลิตร

การตั้งโปรแกรมของเครื่อง Thermal cycling profile (เครื่อง Thermal cycler รุ่น LCX ผลิตโดยบริษัท Perkin – Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา) ดังนี้

- ขั้นตอน initial denature กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ
- ขั้นตอน denature กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 30รอบ
- ขั้นตอน anneal กำหนดอุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ
- ขั้นตอน extend กำหนดอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ
- ขั้นตอน final extension กำหนดอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ตรวจหา PCR product โดยวิธี electrophoresis (เครื่อง Horizontal electrophoresis รุ่น 200 ผลิตโดยบริษัท BRL ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยเตรียม 1.5% agarose gel ใน 0.5X Tris borate EDTA (TBE) buffer เติม ethidium bromide (0.5 µg/ml) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ต้มให้เดือดแล้วตั้งทิ้งไว้ให้อุ่น แล้วเทลงบนแท่นที่เตรียมไว้ จากนั้นนำ PCR product ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ gel loading ปริมาตร 3 ไมโครลิตร นำตัวอย่างไป run ด้วย electrophoresis ประมาณ 30 นาที (ขึ้นกับขนาดของ PCR product) นำแผ่นเจลที่ได้ไปส่องดูใต้แสง UV

แปลผลชนิดของยีน *E. faecium* และ 16S rRNA จากขนาดของ PCR product (ตารางที่ 9)

3.8 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *E faecium* ด้วยเทคนิค DNA-DNA Hybridization (Ezaki et al., 1989)

3.8.1 ขั้นตอนการสกัด DNA

3.8.1.1 เพาะเลี้ยง *E. faecium* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth จำนวน 5 มิลลิลิตร บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3.8.1.2 ถ่ายเชื้อทั้งหมดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth (แบบครึ่งสูตร) จำนวน 95 มิลลิลิตร บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3.8.1.3 เก็บเซลล์โดยการปั่นด้วยเครื่องปั่นแยกสารแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

3.8.1.4 เทสารละลายชั้นบน (supernatant) ทิ้ง จากนั้นทำการล้างเซลล์โดยการเติมสารละลาย Saline-EDTA buffer (pH 8) จำนวน 5 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าแบบวอร์เทกซ์ (vortex mixer) แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

3.8.1.5 เทสารละลายชั้นบนทิ้งแล้วเติมสารละลาย Saline-EDTA buffer (pH 8) จำนวน 2 - 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.8.1.6 ทำการย่อยเซลล์โดยการเติม lysosyme จำนวน 8 – 10 มิลลิกรัม เขย่าเบาๆ นำไปตั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 – 45 นาที หรือจนกว่าสารละลายจะหนืด จากนั้นเติม 10% Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) จำนวน 20 ไมโครลิตร และ 0.1 M Tris NaCl (pH 9) จำนวน 2 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ แล้วนำไปวางที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

3.8.1.7 ทำการตกตะกอนโปรตีนโดยเติมสารละลายของ Phenol:chloroform (1:1) ประมาณ 1.5 เท่าของสารละลาย เขย่าเบาๆ จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

3.8.1.8 ดูดสารละลายชั้นบนมาทำการตกตะกอน DNA โดยเติม 95% แอลกอฮอล์ จำนวน 1.5 เท่า รอสักครู่ แล้วใช้แท่งแก้วพันสาย DNA จากนั้นล้างด้วย 70% แอลกอฮอล์ และ 95% แอลกอฮอล์ ตามลำดับ รอให้แห้งแล้วเก็บไว้ในสารละลาย 0.1% Saline Sodium Citrate (SSC) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.8.2 การทำ DNA ให้บริสุทธิ์ (Tomaoka, 1994)

3.8.2.1 ละลาย DNA ที่ติดแท่งแก้วออกให้หมด

3.8.2.2 ทำการย่อย RNA โดยการเติมสารละลาย RNase A และ RNase T_1 จำนวน 20 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10X SSC จำนวน 20 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ

3.8.2.3 เติมสารละลาย Phenol:chloroform (1:1) ประมาณ 1.5 เท่า เขย่าเบาๆ

3.8.2.4 นำไปปั่นที่ความเร็วรอบที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

3.8.2.5 ดูดสารละลายชั้นบนมาทำการตกตะกอน DNA โดยเติม 95% แอลกอฮอล์ จำนวน 1.5 เท่า รอสักครู่ แล้วใช้แท่งแก้วพันสาย DNA จากนั้นล้างด้วย 70% แอลกอฮอล์ และ 95% แอลกอฮอล์ ตามลำดับ รอให้แห้งแล้วเก็บไว้ในสารละลาย 0.1% SSC ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.8.2.6 วัดปริมาณของ DNA โดยนำสารละลาย DNA ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

3.8.3 การติดฉลาก DNA (Ezaki et al., 1989)

3.8.3.1 การติดฉลาก DNA ด้วยสาร photobiotin

3.8.3.2 นำสารละลาย DNA จำนวน 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย photobiotin จำนวน 15 ไมโครลิตร ลงใน Eppendroff tube แช่ในถาดน้ำแข็ง แล้วนำไปให้ sunlamp เป็นเวลา 25 นาที

3.8.3.3 ทำการล้างสารละลาย photobiotin ที่เหลือออกโดยเติมสารละลาย 0.1M Tris-HCl buffer (pH 9) จำนวน 100 ไมโครลิตร และสาร n-butanol จำนวน 100 ไมโครลิตร จากนั้นดูดสารละลายชั้นบนทิ้งไป

3.8.3.4 นำสารละลาย DNA ที่ติดฉลากแล้วไปต้มในน้ำเดือด นาน 15 นาที จากนั้นนำไปแช่ในถาดน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นนำสารละลายไป sonicate นาน 3 นาที แล้วเติมสารละลาย hybridization ให้ท่วมเพื่อใช้เป็น DNA labeling probe ต่อไป

3.8.4 DNA-DNA hybridization (Ezaki et al., 1989)

3.8.4.1 ดูดสารละลาย DNA จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงใน eppendrof tube นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที แล้วนำมาวางพักไว้ในถังน้ำแข็งสักครู่

3.8.4.2 เติม 2X Phosphate buffer saline (PBS) จำนวน 1.0 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 0.6 มิลลิลิตร และสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ จำนวน 0.6 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ

3.8.4.3 ถ่ายสารละลายลงใน microplate well จำนวน 100 ไมโครลิตร นำ ไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

3.8.4.4 ดูดสารละลายทิ้งไปแล้วมาเติมสารละลาย prehybridization จำนวน 200 ไมโครลิตร นำไปตั้งที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส นาน 15 – 16 ชั่วโมง

3.8.4.5 ดูดสารละลายทิ้งไปแล้วล้างด้วยสารละลาย 0.2X SSC buffer จำนวน 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง

3.8.4.6 เติมสารละลาย solution I จำนวน 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปตั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3.8.4.7 ดูดสารละลาย solution I ทิ้งไป แล้วเติมสารละลาย solution II จำนวน 100 ไมโครลิตร นำไปตั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3.8.4.8 ดูดสารละลายทิ้งไป จากนั้นล้างด้วยสารละลาย PBS จำนวน 200 ไมโครลิตร 3 ครั้ง

3.8.4.9 เติมสารละลาย solution III จำนวน 100 ไมโครลิตร นำไปตั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที สังเกตการณ์เกิดสีของปฏิกิริยา

3.8.4.10 หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 2M H_2SO_4 จำนวน 100 ไมโครลิตร

3.8.4.11 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader (Microplate ManagerR 4.0 Bio-Rad Laboratories, Inc) แล้วทำการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของ DNA (DNA homology) ถ้าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของ DNA มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 70% ถือว่าเป็นเชื้อ *E. faecium* (Wayne et al., 1987)

3.8.4.12 ทำการคำนวณความคล้ายคลึงกันของ DNA (Ezaki et al., 1989)

$$\text{ความคล้ายคลึงกันของ DNA (\%)} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงของ unknown – ค่าดูดกลืนแสงของ Calf thymus x 100}}{\text{ค่าดูดกลืนแสงของ Type strain – ค่าดูดกลืนแสงของ Calf thymus}}$$

3.9 ขอบเขตในการคัดเลือก *E. faecium* เพื่อนำไปใช้เป็นโปรไบโอติก

หลังจากที่ทำการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการแล้ว นำข้อมูลที่ได้ มาทำการวิเคราะห์และคัดเลือก *E. faecium* ที่คัดเลือกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุดในการเพื่อนำ ไปใช้เป็นโปรไบโอติกต่อไป หลักเกณฑ์ในการวิเคราะห์แสดงตามขั้นตอนดังนี้

- *E. faecium* ที่สามารถทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารได้ดี
- *E. faecium* ที่สามารถยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ได้ดี
- *E. faecium* ที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในห้องปฏิบัติการได้ดี ในที่นี้คือ *E. coli*, *S.* Enteritidis และ *S.* Typhimurium
- *E. faecium* ที่มีความไวรับต่อยาปฏิชีวนะหลายชนิด

3.10 เปรียบเทียบคุณสมบัติของ *E. faecium* ที่คัดเลือกได้กับ *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก

เปรียบเทียบความสามารถในการทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหาร ความสามารถยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ และความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ของ *E. faecium* ที่คัดเลือกได้กับ *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก หลังจากทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง (Marcinakova et al., 2004) จากนั้นทำการเปรียบเทียบโดยใช้ One Way ANOVA ($p<0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผลการนับจำนวนและจำแนกสปีชีส์ของ *Enterococcus* จากตัวอย่างไก่พื้นเมือง

ผลการนับจำนวน *Enterococcus* จากตัวอย่างกระเพาะพัก (crop) ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) และลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) โดยใช้ selective medium ซึ่งดัดแปลงจาก Jin และคณะ (2000) พบปริมาณเฉลี่ย *Enterococcus* ในกระเพาะพักเท่ากับ 7.51 $\log_{10}$ CFU/gm ปริมาณเฉลี่ยของ *Enterococcus* ในลำไส้เล็กส่วนต้นเท่ากับ 7.48 $\log_{10}$ CFU/gm และปริมาณเฉลี่ยของ *Enterococcus* ในลำไส้เล็กส่วนปลายเท่ากับ 7.55 $\log_{10}$ CFU/gm (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 Total Viable Count ($\log_{10}$ CFU/gm) ของ *Enterococcus* จากตัวอย่างไก่พื้นเมือง

ตัวอย่าง (n = 30)	Total Viable Count ของ *Enterococcus* ($\log_{10}$CFU/gm) (Mean±SD)		
ไก่พื้นเมือง	กระเพาะพัก	ลำไส้เล็กส่วนต้น	ลำไส้เล็กส่วนปลาย
	7.51±0.45	7.48±0.40	7.55±0.34

คัดเลือก *Enterococcus* จากตัวอย่างไก่สุขภาพดีจำนวน 30 ตัว โดยทำการแยกพิสูจน์ สปีชีส์ของเชื้อ *Enterococcus* จากอวัยวะทั้ง 3 ส่วนดังกล่าว โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบคัดเลือก (selective medium) (Jin et al., 2000) พบ *Enterococcus* ทั้งสิ้น 172 สายพันธุ์ เป็น *E. faecium* จำนวน 60 สายพันธุ์ (34.9%) แบ่งเป็นจากกระเพาะพัก 24 สายพันธุ์ ลำไส้เล็กส่วนต้น 17 สายพันธุ์ และลำไส้เล็กส่วนปลาย 19 สายพันธุ์ *E. faecalis* จำนวน 48 สายพันธุ์ (29.9%) แบ่งเป็นจากกระเพาะพัก 20 สายพันธุ์ ลำไส้เล็กส่วนต้น 13 สายพันธุ์ และลำไส้เล็กส่วนปลาย 15 สายพันธุ์ *E. gallinarum* จำนวน 36 สายพันธุ์ (20.9%) แบ่งเป็นจากกระเพาะพักจำนวน 23 สายพันธุ์ ลำไส้เล็กส่วนต้น 13 สายพันธุ์ และลำไส้เล็กส่วนปลาย 10 สายพันธุ์ *E. durans* จำนวน 24 สายพันธุ์ (13.9%) แบ่งเป็นจากกระเพาะพัก 5 สายพันธุ์ ลำไส้เล็กส่วนต้น 10 สายพันธุ์ และลำไส้เล็กส่วนปลาย 8 สายพันธุ์ และ *E. avium* จำนวน 4 สายพันธุ์ (2.3%) แบ่งเป็นจากกระเพาะพัก 2 สายพันธุ์ ลำไส้เล็กส่วนปลาย 2 สายพันธุ์ ในขณะที่ลำไส้เล็กส่วนต้นตรวจไม่พบ *E. avium* (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ผลการจำแนกสปีชีส์ของ *Enterococcus* จากตัวอย่างไก่พื้นเมือง

Species	จำนวน (isolates)			
	กระเพาะพัก	ลำไส้เล็กส่วนต้น	ลำไส้เล็กส่วนปลาย	รวม
E. faecium	24	17	19	60
E. faecalis	20	13	15	48
E. gallinarum	23	13	10	36
E. durans	5	11	8	24
E. avium	2	-	2	4
			รวม	172

จากนั้นนำ *E. faecium* จำนวนทั้งสิ้น 60 สายพันธุ์ ดังกล่าวมาให้รหัส เพื่อให้ง่ายต่อการวิเคราะห์ผลต่อไป โดย *E. faecium* ที่แยกได้จากกระเพาะพักจำนวน 24 สายพันธุ์ ให้รหัสเป็น EFMC 1 – EFMC 24 สำหรับ *E. faecium* ที่แยกได้จากลำไส้ส่วนต้นจำนวน 17 สายพันธุ์ ให้รหัสเป็น EFMD 25 – EFMD 41 และ *E. faecium* ที่แยกได้จากลำไส้ส่วนปลายจำนวน 19 สายพันธุ์ ให้รหัสเป็น EFMI 42 – EFMI 60 ส่วน *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกให้เป็น EFC

4.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ

4.2.1 ผลการทดสอบความสามารถในการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหาร

การทดสอบความสามารถในการอยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหารในครั้งนี้ มีการแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือความสามารถในการทนต่อกรด (pH 2) และความสามารถในการทนต่อน้ำดี โดยนำ *E. faecium* ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง จำนวน 60 สายพันธุ์ แบ่งเป็นจากกระเพาะพัก 24 สายพันธุ์ ลำไส้เล็กส่วนต้น 17 สายพันธุ์ และลำไส้เล็กส่วนปลาย 19 สายพันธุ์ มาทำการทดสอบ ซึ่งวิธีการทดสอบได้ดัดแปลงจาก Agus (2003) โดยมี *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกเป็นเชื้อควบคุม

ผลการทดสอบความสามารถในการอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารของเชื้อ พบว่ามี *E. faecium* ที่สามารถอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารได้ จำนวน 15 สายพันธุ์ (25%) จากตัว อย่างของ *E. faecium* ทั้งหมด (60 สายพันธุ์) โดยแบ่งได้เป็นจากกระเพาะพัก 5 สายพันธุ์ (33.3%) ลำไส้เล็กส่วนต้น 4 สายพันธุ์ (26.7%) และลำไส้เล็กส่วนปลาย 6 สายพันธุ์ (40.0%) (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 สายพันธุ์ของ *E. faecium* ที่สามารถอยู่รอดในระบบทางเดินอาหาร

ตัวอย่าง	สายพันธุ์
กระเพาะพัก	EFMC 2, EFMC 17, EFMC 21, EFMC 22, EFMC 24
ลำไส้เล็กส่วนต้น	EFMD 25, EFMD 29, EFMD 30, EFMD 32
ลำไส้เล็กส่วนปลาย	EFMI 42, EFMI 44, EFMI 46, EFMI 47, EFMI 49, EFMI 54
ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก	EFC

การทดสอบความสามารถในการทนต่อกรด (pH 2) ในครั้งนี้ ได้แบ่งออกเป็น 4 ระดับ คือ ระดับไม่ทนต่อกรด (อัตราการอยู่รอดได้ <50%) ระดับทนต่อกรดได้น้อย (อัตราการอยู่รอดได้ 50-75%) ระดับทนต่อกรดได้ปานกลาง (อัตราการอยู่รอดได้ 75-90%) และระดับทนต่อกรดได้มาก (อัตราการอยู่รอดได้ >90%) (Agus, 2003) ผลการทดสอบพบว่า *E. faecium* ทั้ง 15 สายพันธุ์ สามารถทนต่อกรดได้ในสองระดับคือ ระดับทนต่อกรดได้น้อยและระดับทนต่อกรดได้ปานกลาง (ตารางที่ 13) สำหรับ *E. faecium* ที่มีระดับการทนต่อกรดได้น้อย มีจำนวน 9 สายพันธุ์ คือ EFMC 2, EFMC 22, EFMD 29, EFMD 30, EFMD 32, EFMI 42, EFMI 44, EFMI 46 และ EFMI 54 โดยพบอัตราการอยู่รอดเป็น 66.6, 68.7, 67.2, 73.9, 69.3, 65.1, 70.7, 63.6 และ 72.2% ตามลำดับ สำหรับ *E. faecium* สายพันธุ์ที่มีระดับการทนต่อกรดได้ปานกลาง มีจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ EFMC 17, EFMC 21, EFMC 24, EFMD 25, EFMI 47 และ EFMI 49 โดยพบอัตราการอยู่รอดเป็น 78.7, 82.6, 81.8, 80.7, 76.5 และ 79.6% ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดลองซ้ำอีก (4 ครั้ง) ใน *E. faecium* สายพันธุ์ที่มีระดับการทนต่อกรดได้ปานกลาง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกสายพันธุ์ ($p>0.05$) ในขณะที่ *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก (EFC) นั้นสามารถทนต่อกรดได้น้อย อัตราการอยู่รอดเป็น 64.3%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 อัตราการอยู่รอดของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง ในการทนต่อกรด (pH 2.0)

สายพันธุ์	ปริมาณเชื้อเหลืออยู่ (log_{10} CFU/mL) (%)	ระดับการทนต่อกรด* (pH 2)
EFMC 2	5.44 (66.5)	น้อย
EFMC 17	6.43 (78.6)	ปานกลาง
EFMC 21	6.75 (82.5)	ปานกลาง
EFMC 22	5.61 (68.6)	น้อย
EFMC 24	6.68 (81.7)	ปานกลาง
EFMD 25	6.59 (80.6)	ปานกลาง
EFMD 29	5.49 (67.1)	น้อย
EFMD 30	6.04 (73.8)	น้อย
EFMD 32	5.66 (69.2)	น้อย
EFMI 42	5.32 (65.0)	น้อย
EFMI 44	5.78 (70.7)	น้อย
EFMI 46	5.2 (63.6)	น้อย
EFMI 47	6.25 (76.4)	ปานกลาง
EFMI 49	6.5 (79.5)	ปานกลาง
EFMI 54	5.9 (72.1)	น้อย
EFC	5.25 (64.2)	น้อย

* ระดับการทนต่อกรดมี 4 ระดับ คือ 1) ไม่ทนต่อกรด มีอัตราการอยู่รอด <50%, 2) ทนต่อกรดน้อย มีอัตราการอยู่รอด 50-75%, 3) ทนต่อกรดปานกลาง มีอัตราการอยู่รอด 75-90%, 4) ทนต่อกรดมาก มีอัตราการอยู่รอด >90%

ผลการทดสอบความสามารถในการทนต่อน้ำดีในเบื้องต้นของ *E. faecium* ทั้ง 15 สายพันธุ์ พบ *E. faecium* ที่ทนต่อน้ำดีได้นาน 1 ชั่วโมง จำนวน 9 สายพันธุ์ (ตารางที่ 14) คือ EFMC 2, EFMC 22, EFMC 25, EFMD 29, EFMD 32, EFMI 42, EFMI 44, EFMI 46 และ EFMI 54 อัตราการอยู่รอดคือ 27.0, 23.9, 64.8, 19.5, 21.8, 22.0, 22.9, 21.3 และ 19.8% ตามลำดับ สายพันธุ์ของ *E. faecium* ที่ทนต่อน้ำดีได้นาน 2 ชั่วโมง มีจำนวน 2 สายพันธุ์ คือ EFMC 17 และ EFMC 24 อัตราการอยู่รอดคือ 36.1 และ 18.7% สายพันธุ์ของ *E. faecium* ที่ทนต่อน้ำดีได้นาน 3 และ 4 ชั่วโมง จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ EFMC 21, EFMD 30, EFMI 47 และ

EFMI 49 อัตราการอยู่รอดคือ 63.0, 71.2, 22.9 และ 39.4% ตามลำดับ สายพันธุ์ของ *E. faecium* ที่ทนต่อน้ำดีได้นาน 4 ชั่วโมง จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ EFMC 21, EFMD 30, EFMI 47 และ EFMI 49 อัตราการอยู่รอด คือ 36.0, 46.9, 21.8 และ 20.3% ตามลำดับ สำหรับ *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก (EFC) นั้นทนต่อน้ำดีได้นาน 1 ชั่วโมง มีอัตราการอยู่รอดคือ 19%

ผลการทดสอบความสามารถในการทนต่อน้ำดีในขั้นยืนยัน โดยทำการทดสอบซ้ำอีก (4 ครั้ง) ใน *E. faecium* สายพันธุ์ EFMC 21, EFMD 30, EFMI 47 และ EFMI 49 พบอัตราการอยู่รอดของ *E. faecium* ที่ทนต่อน้ำดีได้นาน 3 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 65.7, 71.2, 21.3 และ 38.5% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการทนต่อน้ำดี พบว่า *E. faecium* สายพันธุ์ EFMC 21 และ EFMD 30 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ในขณะที่ *E. faecium* สายพันธุ์ EFMI 47 และ EFMI 49 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับอัตราการอยู่รอดของ *E. faecium* ที่ทนต่อน้ำดีได้นาน 4 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 35.7, 43.7, 21.9 และ 21.6% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการทนต่อน้ำดี พบว่า *E. faecium* สายพันธุ์ EFMI 47 และ EFMI 49 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในขณะที่ *E. faecium* สายพันธุ์ EFMC 21 และ EFMD 30 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 ความสามารถในการทนต่อน้ำดีของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง ในเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง

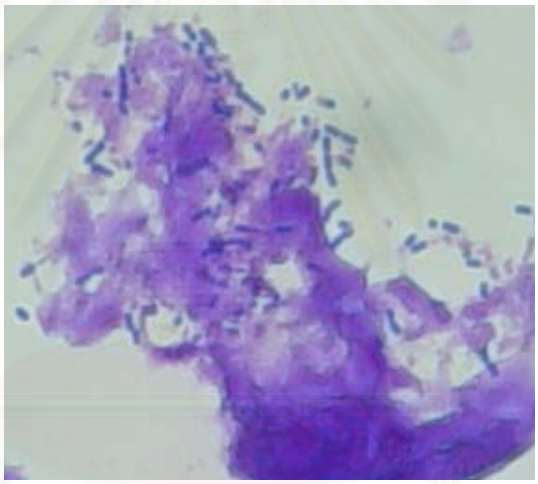
สายพันธุ์	ปริมาณของ *E. faecium* ที่เหลืออยู่ Log_{10} CFU/mL (%)			
	1 ชั่วโมง	2 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	4 ชั่วโมง
EFMC 2	1.47 (27.0)	-	-	-
EFMC17	4.11 (63.9)	2.32 (36.1)	-	-
EFMC 21	5.36 (79.4)	4.30 (63.7)	4.32 (62.7)[a*]	2.35 (35.7)[b*]
EFMC 22	1.34 (23.9)	-	-	-
EFMC 24	5.14 (77.0)	1.25 (18.7)	-	-
EFMD 25	4.27 (64.8)	-	-	-
EFMD 29	1.07 (19.5)	-	-	-
EFMD 30	5.43 (89.9)	4.32 (71.5)	4.36 (71.2)[a*]	2.64 (43.7)[a*]
EFMD 32	1.23 (21.7)	-	-	-
EFMI 42	1.17 (22.0)	-	-	-
EFMI 44	1.32 (22.8)	-	-	-
EFMI 46	1.11 (21.4)	-	-	-
EFMI 47	4.11 (65.8)	1.47 (23.5)	1.35 (21.3)[c*]	1.40 (21.9)[c*]
EFMI 49	5.34 (82.2)	3.30 (50.8)	2.46 (38.5)[b*]	1.38 (20.6)[c*]
EFMI 54	1.17 (19.8)	-	-	-
EFC	1.00 (19.0)	-	-	-

* a, b, c แทนสัญลักษณ์ของค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

4.2.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยึดติดกับเยื่อเมือกลำไส้

การทดสอบประสิทธิภาพในการยึดติดกับเยื่อเมือกลำไส้ สามารถทำได้โดยการนำเชื้อ *E. faecium* ที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองทั้ง 15 สายพันธุ์ มาทำการทดสอบโดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยึดติดกับเยื่อเมือกลำไส้กับเชื้อ *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ (EFC) โดยมี *S.* Enteritidis เป็นแบคทีเรียควบคุมบวก (positive control) และ *Bacillus subtillis* เป็นแบคทีเรียควบคุมลบ (negative control) โดยวิธีการทดสอบได้ดัดแปลงจาก Ehrmann และคณะ (2002) สำหรับเกณฑ์ในการคัดเลือก *E. faecium* ในขั้นตอนนี้ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการยึดติดมากกว่าหรือเท่ากับ *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์

ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยึดติดกับเยื่อเมือกลำไส้พบว่า *E. faecium* ทั้ง 15 สายพันธุ์ สามารถจับยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ได้ (รูปภาพที่ 4, แผนภูมิที่ 1, ตารางที่ 15) โดยพบว่า *E. faecium* สายพันธุ์ที่แยกได้จากกระเพาะพัก (EFMC) นั้นมีประสิทธิภาพในการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้อยู่ในช่วง 39.0 – 49.9%, *E. faecium* สายพันธุ์ที่แยกได้จากลำ ไส้เล็กส่วนต้น (EFMD) นั้นมีประสิทธิภาพในการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้อยู่ในช่วง 41.9 – 50.4%, *E. faecium* สายพันธุ์ที่แยกได้จากลำไส้เล็กส่วนปลาย (EFMI) นั้นมีประสิทธิภาพในการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้อยู่ในช่วง 42.9 – 59.6% สำหรับสายพันธุ์ของ *E. faecium* ที่มีประสิทธิภาพการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้มากกว่า *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก (EFC) คือสายพันธุ์ EFMI 47 และ EFMI 49 มีประสิทธิภาพการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้เท่ากับ 59.6% และ 55.4%ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ของทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)



รูปภาพที่ 4 การยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ของ *E. faecium* ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง

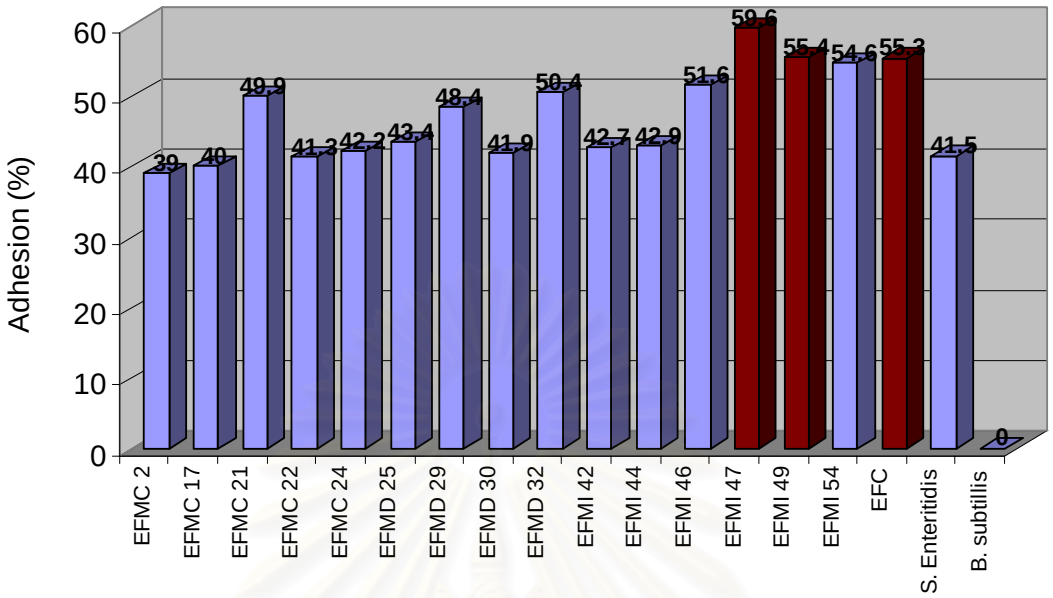
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 ประสิทธิภาพในการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง

สายพันธุ์	ประสิทธิภาพการยึดติด (%) ±SD
EFMC 2	39.0 ± 0.08
EFMC 17	40.0 ± 0.53
EFMC 21	49.9 ± 0.70
EFMC 22	41.3 ± 0.50
EFMC 24	42.2 ± 0.33
EFMD 25	43.4 ± 0.64
EFMD 29	48.4 ± 0.04
EFMD 30	41.9 ± 0.32
EFMD 32	50.4 ± 0.32
EFMI 42	42.7 ± 0.57
EFMI 44	42.9 ± 0.31
EFMI 46	51.6 ± 0.53
EFMI 47	59.6 ± 0.38
EFMI 49	55.4 ± 0.11
EFMI 54	54.6 ± 0.29
EFC	55.3 ± 0.20
Salmonella Enteritidis*	41.5 ± 0.07
*Bacillus subtillis***	-

* positive control ** negative control

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

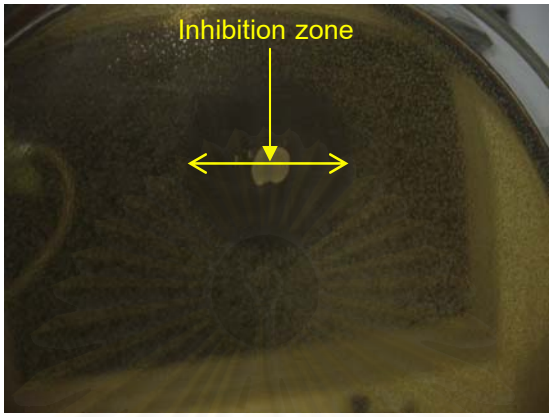


แผนภูมิที่ 1 ประสิทธิภาพในการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง

4.2.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ได้นำ *E. faecium* ที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองทั้ง 15 สายพันธุ์ มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ในการทดสอบครั้งนี้คือ *E.coli*, *S.* Enteritidis, และ *S.* Typhimurium โดยใช้วิธี agar spot (Schillinger and Lücke, 1989) อ่านผลโดยการวัดโซนใส (inhibition zone) รอบๆ โคโลนีของแบคทีเรียคัดเลือก (รูปภาพที่ 5) สำหรับเกณฑ์ในการคัดเลือก *E. faecium* ในขั้นตอนนี้ คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคมากกว่าหรือเท่ากับ *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิต ภัณฑ์โปรไบโอติก (EFC)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปภาพที่ 5 Inhibition zone ของ *E. faecium* ที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองทดสอบโดยวิธี agar spot

ผลการทดสอบพบว่า *E. faecium* ที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองทั้งสิ้น 15 สายพันธุ์นั้น สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค (*E.coli*, *S.* Enteritidis และ *S.* Typhimurium) ได้ทั้งหมด (ตารางที่ 16, แผนภูมิที่ 2) โดยพบว่าสายพันธุ์ ของ *E. faecium* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E.coli* ได้มากกว่า *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ คือ *E. faecium* สายพันธุ์ EFMC 17 และ EFMC 21 สำหรับสายพันธุ์ของ *E. faecium* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S.* Enteritidis ได้มากกว่า *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ คือ *E. faecium* สายพันธุ์ EFMC 24 และ EFMI 46 สำหรับสายพันธุ์ของ *E. faecium* ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S.* Typhimurium ได้มากกว่า *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก คือ *E. faecium* สายพันธุ์ EFMC 24, EFMD 29, EFMD 30 และ EFMI 49

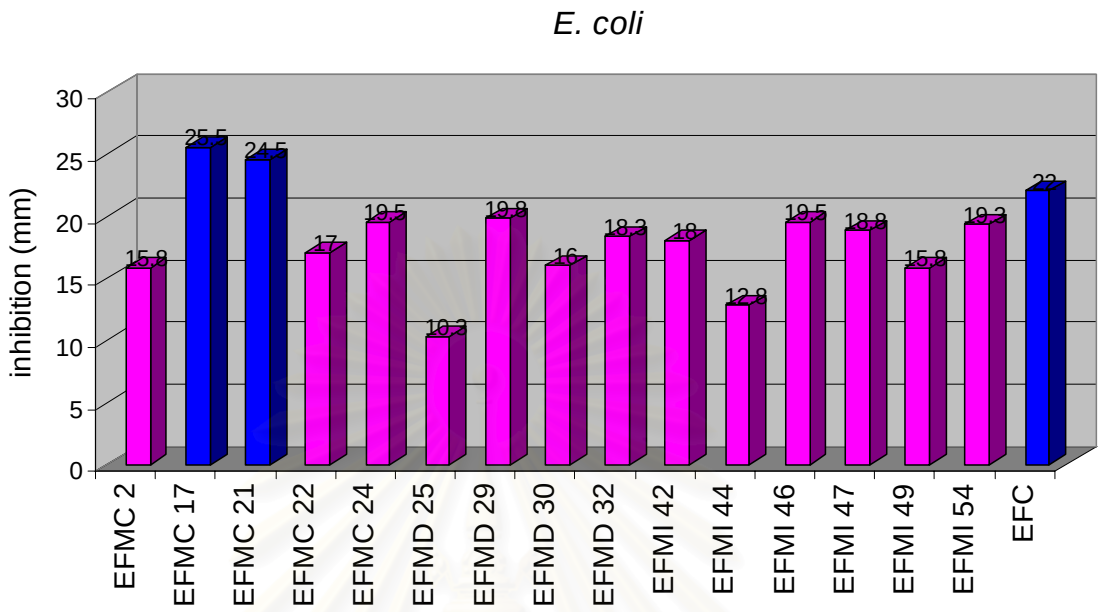
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง

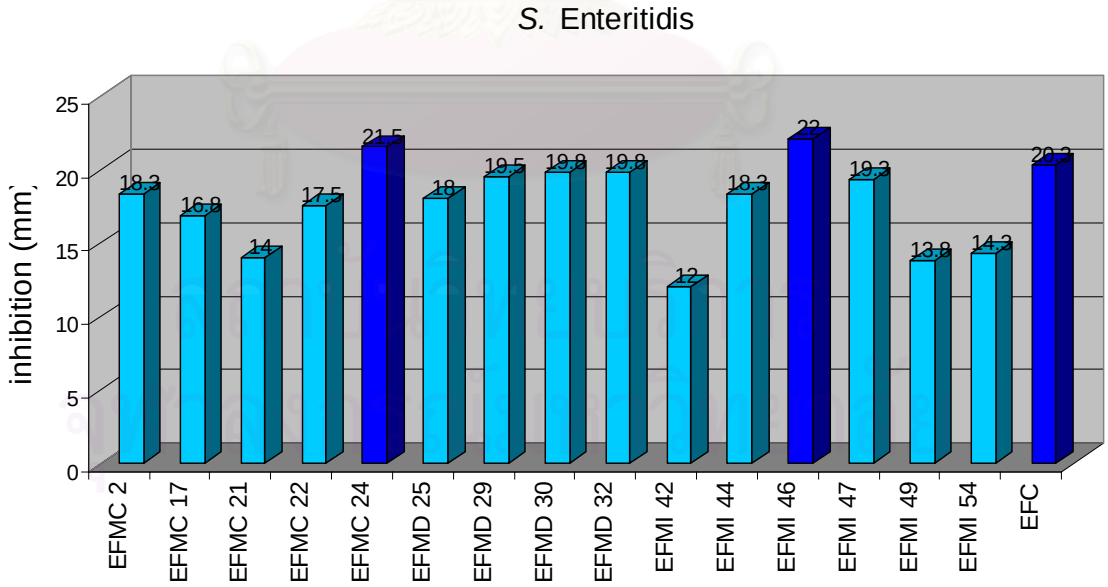
สายพันธุ์	ค่าเฉลี่ยของขอบเขตในการยับยั้ง (inhibition zone)* (%การเปลี่ยนแปลง)		
	E. coli	*Salmonella* Enteritidis	*Salmonella* Typhimurium
EFMC 2	15.8 (71.6)	18.3 (89.9)	19.3 (98.7)
EFMC 17	25.5 (115.9)	16.8 (82.5)	16.8 (85.9)
EFMC 21	24.5 (111.4)	14.0 (69.0)	15.8 (80.8)
EFMC 22	17.0 (77.3)	17.5 (86.2)	19.0 (97.4)
EFMC 24	19.5 (88.6)	21.5 (105.9)	20.0 (102.6)
EFMD 25	10.3 (46.6)	18.0 (88.7)	16.8 (85.6)
EFMD 29	19.8 (89.8)	19.5 (96.1)	20.3 (103.8)
EFMD 30	16.0 (72.7)	19.8 (97.3)	19.8 (101.3)
EFMD 32	18.3 (83.0)	19.8 (97.3)	18.8 (96.2)
EFMI 42	18.0 (81.8)	12.0 (59.1)	18.5 (94.9)
EFMI 44	12.8 (58.0)	18.3 (89.9)	18.8 (96.2)
EFMI 46	19.5 (88.6)	22.0 (108.4)	19.0 (97.4)
EFMI 47	18.8 (85.2)	19.3 (94.8)	19.0 (97.4)
EFMI 49	15.8 (71.6)	13.8 (67.7)	20.8 (106.4)
EFMI 54	19.3 (87.5)	14.3 (70.2)	17.0 (87.2)
EFC	22.0 (100)	20.3 (100)	19.5 (100)

* หน่วยเป็น มิลลิเมตร

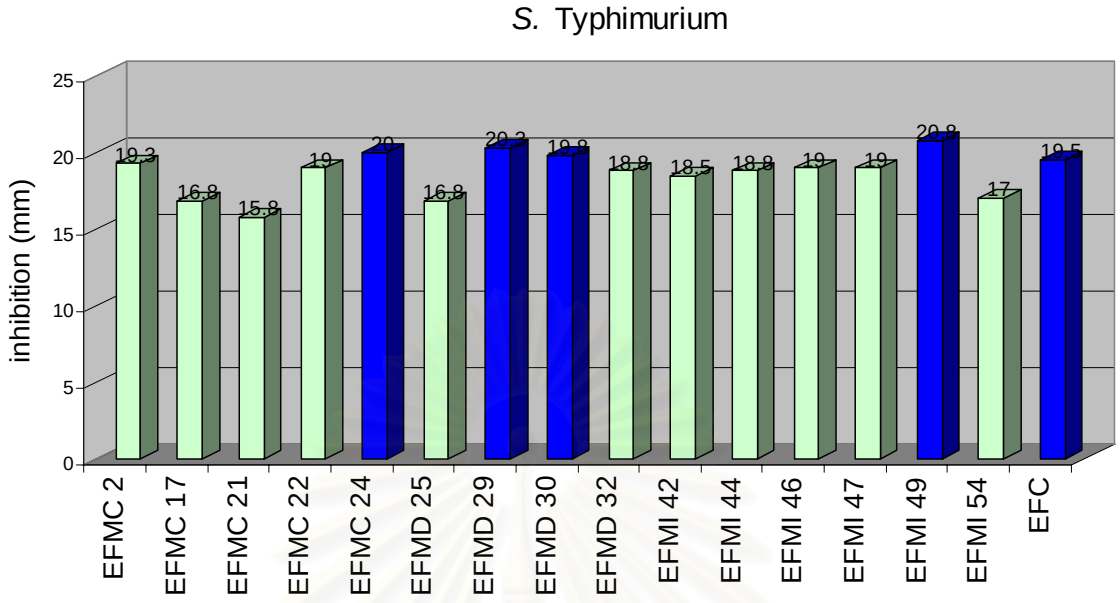
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



แผนภูมิที่ 2 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *E.coli* ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง



แผนภูมิที่ 3 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *S.* Enteritidis ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง



แผนภูมิที่ 4 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *S.* Typhimurium ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง

4.2.4 ผลการทดสอบหาชนิดของสารยับยั้งแบคทีเรียอื่น

การทดสอบหาชนิดของสารยับยั้งแบคทีเรียอื่น โดยนำ *E. faecium* ที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองทั้ง 15 สายพันธุ์ มาทำการตรวจสอบหาชนิดของสารยับยั้งที่สร้างขึ้น เพื่อเป็นการทดสอบเบื้องต้นว่าสารที่สร้างออกมานั้นน่าจะเป็นสารชนิดใดสำหรับการทดสอบครั้งนี้ได้ทำการตรวจสอบหาสารสำคัญ ได้แก่ กรด แบคเทอริโอซิน และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งวิธีการทดสอบได้ดัดแปลงจาก Ketkaew และคณะ (2005)

ผลการทดสอบหาชนิดของสารยับยั้งแบคทีเรียอื่น ใน *E. faecium* ทั้ง 15 สายพันธุ์ พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถสร้างกรดได้ มี 4 สายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอริโอซินได้ คือ EFMC 21, EFMD 25, EFMI 47 และ EFMI 49 ในขณะที่ทุกสายพันธุ์ไม่สามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ สำหรับ EFC สามารถสร้างกรดและแบคเทอริโอซินได้แต่ไม่สามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 ชนิดสารยับยั้งแบคทีเรียอื่นที่สร้างจาก *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง

สายพันธุ์	ชนิดของสารยับยั้ง		
	กรด	แบคเทอริโอซิน	ไฮโตรเจนเปอร์ออกไซด์
EFMC 2	+	-	-
EFMC 17	+	-	-
EFMC 21	+	+	-
EFMC 22	+	-	-
EFMC 24	+	-	-
EFMD 25	+	+	-
EFMD 29	+	-	-
EFMD 30	+	-	-
EFMD 32	+	-	-
EFMI 42	+	-	-
EFMI 44	+	-	-
EFMI 46	+	-	-
EFMI 47	+	+	-
EFMI 49	+	+	-
EFMI 54	+	-	-
EFC	+	+	-

+, สร้าง; -, ไม่สร้าง

4.2.5 ผลการทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ

การทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพนั้น แสดงให้ทราบถึงรูปแบบความไวรับต่อยาต้นจุลชีพของแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียเหล่านั้นเป็นโปรไบโอติกต่อไปได้ เนื่องจากแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus* เป็นแบคทีเรียที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี ทำให้แบคทีเรียสามารถที่จะอยู่รอดและนำพาเอายีนดื้อยาถ่ายทอดให้กับแบคทีเรียสปีชีส์อื่นได้ ซึ่งเป็นโอกาสในการเพิ่มแบคทีเรียดื้อยาในสิ่ง แวดล้อมมากขึ้น นอกจากนั้นแล้วแบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติกมักจะไม่นำเอาแบคทีเรีย

ที่ดื้อต่อยาต้านจุลชีพมาใช้ เนื่องจากว่าจะเป็นการเพิ่มปัญหาในเรื่องของแบคทีเรียดื้อต่อยาต้านจุลชีพเพิ่มมากขึ้นซึ่งปัญหาที่ตามมาก็คือจะทำให้เรารักษาโรคที่เกิดจากแบคทีเรียนั้นยากยิ่งขึ้น

ผลการทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของ *E. faecium* ทั้ง 15 สายพันธุ์ มาทดสอบความไวรับต่อยาต้านจุลชีพ 11 ชนิด โดยใช้วิธี Disk Diffusion Technique (CLSI. 2007) พบว่าเกือบทุกสายพันธุ์มีความไว (susceptible) ต่อยา trimethoprim และ vancomycin การดื้อต่อยา ampicillin พบว่าเกือบทุกสายพันธุ์มีความไวรับต่อยา ยกเว้นสายพันธุ์ EFMC 2 และ EFMI 49 ที่ดื้อ (resistance) ต่อยา การดื้อต่อยา amoxicillin+clavulanic acid พบว่าเกือบทุกสายพันธุ์มีความไวรับต่อยา ยกเว้นสายพันธุ์ EFMI 42 ที่ดื้อต่อยา การดื้อต่อยา cefotaxime พบว่าเกือบทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยา ยกเว้นสายพันธุ์ EFMC 2 มีความไวรับต่อยาในระดับกลาง (intermediate) การดื้อต่อยา ciprofloxacin พบว่าเกือบทุกสายพันธุ์มีความไวต่อยา ยกเว้นสายพันธุ์ EFMC 22, EFMD 30 และ EFMI 42 ที่มีความไวต่อยาในระดับกลาง การดื้อต่อยา chloramphenicol พบว่าเกือบทุกสายพันธุ์มีความไวต่อยา ยกเว้นสายพันธุ์ EFMC 2, EFMC 17, EFMI 49 ที่ดื้อต่อยา และสายพันธุ์ EFMI 54 ที่มีความไวต่อยาในระดับกลาง การดื้อต่อยา gentamycin พบว่าเกือบทุกสายพันธุ์มีความไวต่อยา ยกเว้นสายพันธุ์ EFMD 29 ที่มีความไวต่อยาในระดับกลาง การดื้อต่อยา erythromycin พบว่าเกือบทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยา ยกเว้นสายพันธุ์ EFMC 21, EFMD 29, EFMI 42 และ EFC มีความไวรับต่อยา สำหรับสายพันธุ์ EFMC 24, EFMD 32 และ EFMI 44 มีความไวรับต่อยาในระดับกลาง สำหรับ *E. faecium* สายพันธุ์ที่มีการดื้อต่อยา trimethoprim+sulphamethoxazole พบว่าเกือบทุกสายพันธุ์มีความไวรับต่อยา ยกเว้นสายพันธุ์ EFC ที่ดื้อต่อยา การดื้อต่อยา tetracyclin พบว่าเกือบทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยา ยกเว้นสายพันธุ์ EFMC 22, EFMC 24, EFMD 29, EFMI 42 และ EFC มีความไวรับต่อยา (ตารางที่ 18)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 ความไวรับต่อยาต้านจุลชีพของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง

สายพันธุ์	ความไวรับของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ*										
	AMC	AMP	CTX	CIP	CHPC	CN	ERY	SXT	TET	VAN	W
EFMC 2	S	R	I	S	R	S	R	S	R	S	S
EFMC 17	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S
EFMC 21	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
EFMC 22	S	S	R	I	S	S	R	S	S	S	S
EFMC 24	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S	S
EFMD 25	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S
EFMD 29	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S
EFMD 30	S	S	R	I	S	S	R	S	R	S	S
EFMD 32	S	S	R	S	S	S	I	S	R	S	S
EFMI 42	R	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S
EFMI 44	S	S	R	S	S	S	I	S	R	S	S
EFMI 46	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S
EFMI 47	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S
EFMI 49	S	R	R	S	R	S	R	S	R	S	S
EFMI 54	S	S	R	S	I	S	R	S	R	S	S
EFC	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S

* R, resistance; I, intermediate; S, susceptible

AMC, Amoxicillin+Clavulanic acid (20+10 ug); AMP, Ampicillin (10ug)

CTX, Cefotaxime (30 ug); CIP, Ciprofloxacin (5 ug)

CHPC, Chloramphenicol (30 ug); CN, Gentamycin (10 ug)

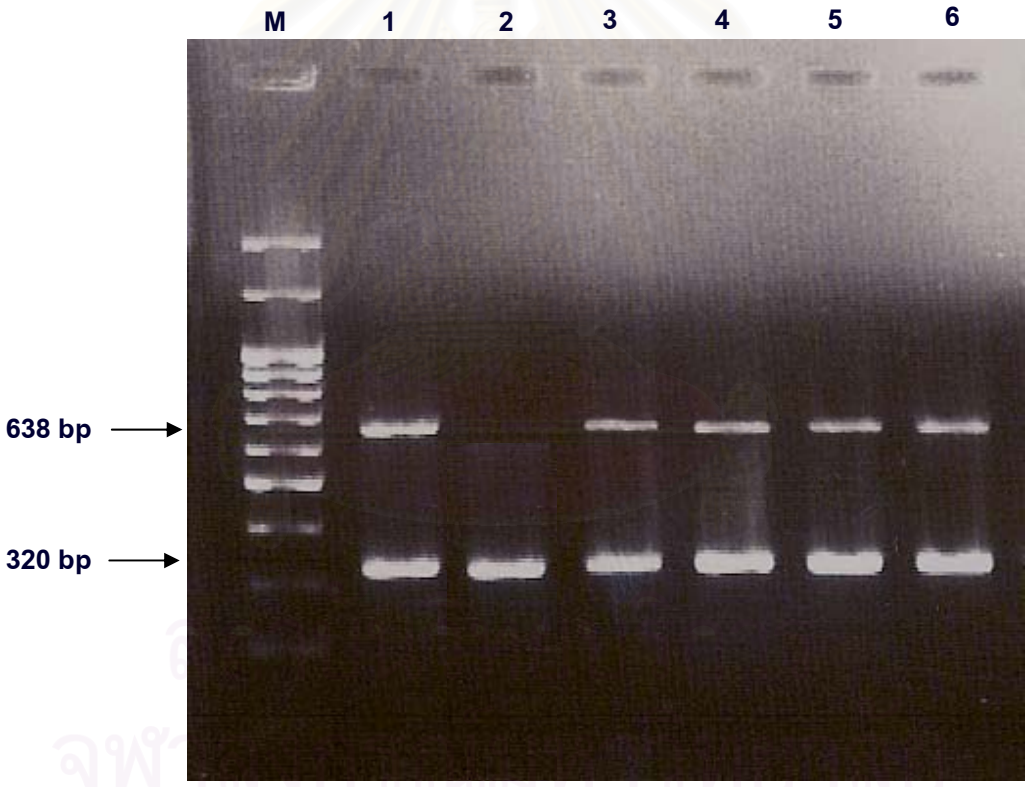
ERY, Erythromycin (15 ug); SXT, Trimethoprim+Sulphamethoxazole (1.25+23.75 ug)

TET, Tetracyclin (30 ug); VAN, Vancomycin (30 ug); W, Trimethoprim (5 ug)

4.2.6 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *E. faecium* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *E. faecium* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งดัดแปลงจาก Kariyama และคณะ (2000) โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะต่อยีน 16S rRNA และยีน *E. faecium* มีขนาด PCR product ที่ 320 และ 638 bp ตามลำดับ โดยนำเชื้อ *E. faecium* จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ EFMC 21, EFMD 30, EFMI 47 และ EFMI 49 ที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่โดดเด่น คือ สามารถทนต่อกรด (pH 2) ทนต่อน้ำดีได้นานถึง 4 ชั่วโมง และสามารถสร้างแบคทอริโอซินได้

ผลจากการตรวจสอบพบว่าทุกสายพันธุ์เป็น *E. faecium* (EFMC 21, EFMD 30, EFMI 47 และ EFMI 49) โดยให้ PCR product ที่ 320 bp (*E. faecium* gene) และ 638 bp (16S rRNA gene) (รูปภาพที่ 6)



รูปภาพที่ 6 PCR product ของ *E. faecium* (EFMC 21, EFMD 30, EFMI 47 และ EFMI 49) ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง M, Marker; 320 bp (*E. faecium* gene) 638 bp (16S rRNA gene); lane 1, *E. Faecium* (positive control); lane 2, *E. faecalis* (negative control); lane 3, EFMC 21; lane 4, EFMD 30; Lane 5, EFMI 47; lane 6, EFMI 49

4.2.7 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *E. faecium* ด้วยเทคนิค DNA-DNA hybridization

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *E. faecium* ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง จำนวน 4 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ EFMC 21, EFMD 30, EFMI 47 และ EFMI 49 ด้วยเทคนิค DNA-DNA hybridization ตามวิธีการของ Ezaki และคณะ (1989) โดยมีเชื้อ *E. faecium* NRIC1145 เป็น type strain

ผลจากการตรวจสอบพบว่า *E. faecium* ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง ทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ EFMC 21, EFMD 30, EFMI 47 และ EFMI 49 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของ DNA ต่อ *E. faecium* NRIC1145^{T} เป็น 81.0, 78.1, 82.4 และ 78.6 ตามลำดับ (ตารางที่ 19) ซึ่งพบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์นั้น มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของ DNA มีค่ามากกว่า 70% จึงจัดว่าเป็น *E. faecium* (Wayne et al., 1987)

ตารางที่ 19 ความคล้ายคลึงของ DNA-DNA homology ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง

สายพันธุ์	ความคล้ายคลึงของ DNA ต่อ *E. faecium* NRIC1145^{T} (%)
EFMC 21	81.0
EFMD 30	78.1
EFMI 47	82.4
EFMI 49	78.6
E. faecium NRIC1145^{T}	100.0
E. hirae TISTR943^{T}	22.3
E. faecalis TISTR379^{T}	9.8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในปัจจุบันการนำเอาโปรไบโอติกมาใช้ในการเลี้ยงปศุสัตว์นั้นได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งวงการการเลี้ยงไก่ เนื่องจากโปรไบโอติกมีส่วนช่วยปรับความสม ดุลของแบคทีเรียในลำไส้ เสริมสร้างการเจริญเติบโต และทำให้สัตว์แข็งแรง แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนั้นส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ มีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อทำการคัดเลือกเชื้อ *E. faecium* จากไก่พื้นเมืองมาใช้เป็นโปรไบโอติก

โดยคัดเลือก *Enterococcus* จากตัวอย่างไก่สุขภาพดีจำนวน 30 ตัว โดยทำการแยกเชื้อ *Enterococcus* จากอวัยวะทั้ง 3 คือ กระเพาะพัก ลำไส้เล็กส่วนต้น ลำไส้เล็กส่วนปลาย โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบคัดเลือก (selective medium) (Jin et al., 2000) พบ *Enterococcus* ทั้งสิ้น 172 สายพันธุ์ ผลจากการพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *E. faecium* จำนวน 60 สายพันธุ์ *E. faecalis* จำนวน 48 สายพันธุ์ *E. gallinarum* จำนวน 36 สายพันธุ์ *E. durans* จำนวน 24 สายพันธุ์ และ *E. avium* จำนวน 4 สายพันธุ์ จากนั้นนำ *E. faecium* จำนวน 60 สายพันธุ์ ที่แยกได้มาทดสอบคุณสมบัติของโปรไบโอติก โดยมี *E. faecium* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก (EFC) เป็นเชื้อเปรียบเทียบ การทดสอบคุณสมบัติของโปรไบโอติกในเบื้องต้นประกอบด้วย การอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารซึ่งได้แบ่งออกเป็นการทดสอบการทนต่อกรด (pH 2) และการทดสอบเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น 10% ผลการทดสอบพบเชื้อ *E. faecium* จำนวน 15 สายพันธุ์ ที่สามารถทนต่อกรดได้ คือสายพันธุ์ EFMC 2, EFMC 17, EFMC 21, EFMC 22, EFMC 24, EFMD 25, EFMD 29, EFMD 30, EFMD 32, EFMI 42, EFMI 44, EFMI 46, EFMI 47, EFMI 49, และ EFMI 54 ทั้งนี้ความสามารถในการทนต่อกรด ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์นั้น อาจเนื่องมาจากเชื้อมีถิ่นอาศัย (habitat) อยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งมีการสัมผัสและทำปฏิกิริยากับกรดอยู่ตลอดเวลา จึงทำให้แบคทีเรียมีการทนต่อกรดได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง lactic acid bacteria เช่น lactobacilli, bifidobacteria รวมไปถึง enterococci ด้วย (Franz et al., 1999) นอกจากนั้นการทนต่อกรดของแบคทีเรียยังพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับโปร ตีนกลุ่มหนึ่ง คือ heat shock protein เป็นโปรตีนที่จะแสดงออก (expression) เมื่อเซลล์สัมผัสกับ heat shock factor เช่น ความร้อน กรด สารเคมี เป็นต้น โปรตีนที่อยู่ในกลุ่มนี้ เช่น methionine sulfoxide reductase และ F_1F_0-ATPase เป็นต้น heat shock protein แบ่งออกได้เป็น 3 family ได้แก่ Hsp60, Hsp70 และ Hsp90 ซึ่งในแต่ละ family จะประกอบด้วยโปรตีนอีกหลายชนิด โดยหน้าที่ของโปรตีนเหล่านี้มีความแตกต่างกัน เช่น F_1F_0-ATPase จัดอยู่ใน Hsp60 เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยน adenosine

triphosphate (ATP) กลายเป็น adenosine diphosphate (ADP) โดยเอนไซม์ ATPase จะทำหน้าที่ดึงหมู่ phosphate ออกจาก

ATP ได้เป็น ADP ซึ่งสามารถพบ heat shock protein ได้ในสิ่งมีชีวิต เอนไซม์ในกลุ่ม ATPase จะถูกสร้างขึ้นโดยมีกรด เป็น heat shock factor แบ่งออกตามโครงสร้างได้ 5 ชนิด คือ F-ATPase, V-ATPase, A-ATPase, P-ATPase และ E-ATPase ซึ่งเอนไซม์ ATPase ที่มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการทนกรดของแบคทีเรียคือ F-ATPase เอนไซม์นี้เป็น transmembrane protein ที่พบได้ในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ ATP โดยชักนำโปรตอน (proton) เช่น โซเดียมไอออน (Na^+) และโพแทสเซียมไอออน (K^+) มาอยู่ที่ผิวเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้สภาวะที่ผิวเซลล์ของแบคทีเรียเป็นด่าง ดังนั้นเมื่อแบคทีเรียอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด เช่น ในกระเพาะอาหาร เป็นต้น แบคทีเรียจึงสามารถอยู่รอดได้เนื่องจากเกิดสภาวะเป็นกลางที่ผิวเซลล์ของแบคทีเรีย (Schlesinger, 1990) สำหรับ lactic acid bacteria นั้นมีหลายสปีชีส์ที่สามารถสร้างเอนไซม์นี้ได้เมื่ออยู่ในสภาวะกรด เช่น *Lactobacillus acidophilus* (Kullen and Klaenhammer, 1999), *L. lactis* (Koebmann et al., 2000) *Enterococcus hirae* (ชื่อเดิมคือ *Streptococcus faecalis*) (Kobayashi et al., 1984) แต่สำหรับ *E. faecium* ยังไม่มีรายงาน

สำหรับความสามารถทนต่อน้ำดีนั้นพบว่ามี *E. faecium* จำนวน 15 สายพันธุ์ ที่ทนต่อน้ำดีได้นาน 1 ชั่วโมง คือสายพันธุ์ EFMC 2, EFMC 17, EFMC 21, EFMC 22, EFMC 24, EFMD 25, EFMD 29, EFMD 30, EFMD 32, EFMI 42, EFMI 44, EFMI 46, EFMI 47, EFMI 49, และ EFMI 54 พบ *E. faecium* จำนวน 6 สายพันธุ์ที่สามารถทนต่อน้ำดีได้นาน 2 ชั่วโมง คือสายพันธุ์ EFMC 17, EFMC 21, EFMD 24, EFMD 30, EFMI 47 และ EFMI 49 และพบ *E. faecium* จำนวน 4 สายพันธุ์ ที่สามารถทนต่อน้ำดีได้นาน 3 และ 4 ชั่วโมง คือสายพันธุ์ EFMC 21, EFMD 30, EFMI 47 และ EFMI 49 สำหรับความสามารถในการทนต่อน้ำดีนั้นมีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ bile salt hydrolyses (BSH) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยกรดน้ำดีและทำลายความเป็นพิษ (detoxification) ของน้ำดี โดยการเข้าไปรวมตัว (conjugated) กับน้ำดี (Moser and Savage, 2001) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ก็น่าจะมีแนวโน้มในการทนต่อน้ำดีได้ จากรายงานการศึกษาในปี 1995 พบว่าแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ (De et al., 1995) สำหรับแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus* พบว่ามีหลายสปีชีส์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ BSH นี้ได้ เช่น *E. faecium*, *E. faecalis* และ *E. durans* (Agus, 2003) ดังนั้นเอนไซม์ BSH อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ให้แบคทีเรียสามารถทนต่อน้ำดีในลำไส้ได้

คุณสมบัติของโปรไบโอติกที่ทำการทดสอบต่อมาคือ การยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ ซึ่งเป็นการทดสอบที่แสดงให้เห็นว่า เมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ร่างกายผ่านกระเพาะอาหารไปได้แล้วสามารถที่ colonize ในลำไส้ได้ โดยนำ *E. faecium* ทั้ง 15 สายพันธุ์ มาทำการทดสอบความ สามารถใน

การยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ พบว่า *E. faecium* ทั้ง 15 สายพันธุ์ สามารถยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ได้ และพบว่ามี *E. faecium* จำนวน 2 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับ EFC คือสายพันธุ์ EFMI 47 และ EFMI 49 สำ หรับกลไกในการจับเกาะต่อผนังลำไส้นั้น สามารถเกิดได้ทั้งเป็นแบบจำเพาะ (receptor-specific binding) แบบใช้แรงวาลเดอวาลส์ (Van-der-Waal's force) แบบใช้ประจุ (charge) และปฏิกิริยาการชอบน้ำ (hydrophobic interaction) โดยส่วนใหญ่แล้วกลไกการจับเกาะของ lactic acid bacteria นั้นพบว่าแบคทีเรียจะมีการสร้าง cell surface hydrophobicity (CSH) มีผลทำให้ผิวเซลล์ของแบคทีเรียมีคุณสมบัติชอบน้ำ สามารถที่จะทดสอบได้โดย Salt Aggregation Test (SAT) (Strus et al., 2001) นอกจากนั้นแบคทีเรียยังสามารถสร้างโปรตีนบางชนิดขึ้นมาแสดง ออกบนผิวเซลล์ ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่ม extracellular matrix molecules (EMC) เช่น collagens, fibronectin, thrombospondin และ vitronectin โดยโปรตีนเหล่านี้จะจับเกาะได้กับชั้นเยื่อเมือก (Howard et al., 2000; Lorca et al., 2002) การยึดติดของแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus* กับเยื่อเมือกผนังลำไส้ พบว่าเป็นลักษณะแบบไม่จำเพาะ สามารถพบได้ทั้งแบบ Van-der-Waal's force และแบบ hydrophobic interaction (Agus, 2003) นอกจากนั้นยังมีรายงานการตรวจพบโปรตีนในกลุ่ม EMC เช่น collagen I binding และ bovine lactoferrin binding ในแบคทีเรียสกุล *Enterococcus* อีกด้วย (Styriak et al., 2002)

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของ *E. faecium* ที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองทั้ง 15 สายพันธุ์ พบว่ามี *E. faecium* จำนวน 7 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับ EFC คือ EFMC 17, EFMC 21, EFMC 24, EFMD 29, EFMD 30, EFMI 46 และ EFMI 49 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าวนั้น ได้ทดลองในสภาวะที่ไม่ได้จำกัดการสร้างกรด แบคเทอริโอซิน หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่อย่างไรก็ตามผลการทดสอบเบื้องต้นของการตรวจหาชนิดของสารยับยั้งแบคทีเรียอื่นที่ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์สร้างขึ้นนั้น พบว่าสามารถสร้างกรดได้ในทุกสายพันธุ์ และพบว่ามี 4 สายพันธุ์ ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ คือ EFMC 21, EFMD 25, EFMI 47 และ EFMI 49 ในขณะเดียวกันทุกสายพันธุ์ไม่สามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่เกิดขึ้นนี้ อาจเป็นผลมาจากเป็นฤทธิ์ของกรด และแบคเทอริโอซิน (Franz et al., 1999) มีรายงานการศึกษาพบว่า *E. faecium* สายพันธุ์ EK 13 สามารถสร้างแบคเทอริโอซินชนิด A (enterocin A) ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* spp. ได้ (Laukava et al., 2003) รายงานการศึกษาพบว่า *E. faecium* สายพันธุ์ RJ16 สามารถสร้าง enterocin AS-48 ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (Samir et al., 2005) และ *S.* Pullorum ได้ (Carina et al., 2000)

จากผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *E. faecium* ที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองทั้ง 15 สายพันธุ์ ประกอบด้วยความสามารถในการทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหาร

แบ่งเป็นการทนกรด ทนน้ำดี ความสามารถในการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และสารยับยั้งแบคทีเรียอื่น ที่ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์สร้างขึ้น สามารถสรุปได้ว่า *E. faecium* ทั้ง 15 สายพันธุ์นั้น พบ *E. faecium* จำนวน 2 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่ดีที่สุดคือ EFMI 47 และ EFMI 49 เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อกรด (pH 2) ได้ในระดับปานกลาง ทนต่อน้ำดีได้นานถึง 4 ชั่วโมง สามารถยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ได้ดีที่สุด สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ และสามารถสร้างกรดและแบคเทอริโอซินได้ การศึกษารูปแบบการดื้อต่อยาต้านจุลชีพโดยใช้เทคนิค Disk diffusion test ผลจากการทดสอบพบว่า *E. faecium* ทั้งสองสายพันธุ์ (EFMI 47 และ EFMI 49) มีความไวรับต่อยาต้านจุลชีพทั้ง 11 ชนิด คือ amoxicillin+clavulanic, ciprofloxacin, gentamycin, trimethoprim+ sulphamethoxazole, vancomycin และ trimethoprim ในขณะเดียวกันดื้อต่อยาต้านจุลชีพ cefotaxime, erythromycin และ tetracyclin นอกจากนั้นยังได้ทำการยืนยันสปีชีส์อีกครั้งด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) และ DNA-DNA hybridization ผลจากการตรวจสอบยืนยันสปีชีส์โดยใช้เทคนิค PCR พบว่าทั้งสองสายพันธุ์เป็น *E. faecium* และผลจากการตรวจสอบยืนยันสปีชีส์โดยใช้เทคนิค DNA-DNA hybridization พบว่าทั้งสองสายพันธุ์มีความคล้ายคลึงของ DNA (DNA-DNA homology) ต่อเชื้อ *E. faecium* NRIC1145 สูงถึง 82.4 และ 78.6% ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อทำการคัดเลือก *E. faecium* จากไก่พื้นเมืองมาใช้เป็นโปรไบโอติก โดยทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วยความ สามารถในการทนต่อสภาวะในระบบทางเดินอาหารแบ่งเป็นการทนกรด ทนน้ำดี ความสามารถในการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และสารยับยั้งแบคทีเรียอื่นที่จากผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *E. faecium* ที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองทั้ง 15 สายพันธุ์ พบ *E. faecium* จำนวน 2 สายพันธุ์ ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกได้ดีที่สุดคือ EFMI 47 และ EFMI 49

การศึกษาในครั้งเป็นเพียงการศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อให้ได้มาซึ่งสายพันธุ์ของเชื้อที่มีศักยภาพสามารถนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกได้ในอนาคต แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาต่อเพิ่มเติมในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) เพื่อทำการศึกษาประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต การลดแบคทีเรียก่อโรค เป็นต้น ควรมีการศึกษาการทนต่อกระบวนการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์รวม ถึงความคงทนของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ เพื่ออนาคตจะได้มีผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่เป็นของประเทศไทยมีความเหมาะสมต่อสัตว์เศรษฐกิจในบ้านเราอย่างแท้จริง

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ศูนย์ปฏิบัติการสารสนเทศกรมปศุสัตว์. 2548. มูลค่าการนำเข้า/ส่งออกสินค้าปศุสัตว์ มกราคม 2548 (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก: http://www.dld.go.th/doc/imex481.html.

สมาคมส่งเสริมผู้ใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์. 2542. พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ P7 หัวข้อ: ประเภทสารเสริมชีวนะ (ออนไลน์). เข้าถึงได้จาก: http://www.feedusers.com/th/viewnews.php?ArtID=309

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ และ สาโรจน์ ค้าเจริญ. 2535. การใช้สารโปรไบโอติกในอาหารสัตว์. สาส์นไก่และการเกษตร, 40 (กรกฎาคม): 13-15

ภาษาอังกฤษ

Agus, W. 2003. Investigation into the influence of a bacteriocin - producing *Enterococcus* strain on the intestinal microflora. Thesis, Graduate School, Karlsruhe University, Germany. 41-42.

Alder, H. E. and Damassa, A. J. 1980. Effects of ingested lactobacilli on *Salmonella* Infantis and *Escherichia coli* and on intestinal flora, pasted vent and chick growth. Avian Diseases. 24: 868-878.

Althouse, C., Patterson, S., Fedorka-Cray, P. and Isaacson R. E. 2003. Type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bind to enterocytes and contribute to colonization of swine *in vivo*. Infect. Immun. 71(11): 6446-6452.

Audisio, M. C., Oliver, G., and Apella, M. C. 2000. Protective effect of *Enterococcus faecium* J96, a potential probiotic strain, an chicks infected with *Salmonella* Pullorum. J. Food Prot. 63: 1333-1337.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. p: 1-72. In, S. Salminen and A. Von Wright (eds). Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, 2nd edition. Marcel Dekker, Inc, New York

Bellomo, G., Mangiagle, A., Nicastto, L., and Frigerio, 0. 1980. A controlled double blind study of *Enterococcus faecium* SF68 strain as a new biological preparation for the treatment of diarrhoea in pediatrics. Cur. Ther. Res. 70: 1717-1720.

Benyacoub, J., Czarnecki-Maulden, G. L., Cavadini, C., Sauthier, T., Anderson, R. E., Schiffrin, E. J. and Von Der Weid, T. 2003. Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. J. Nutr. 133: 1158-1162.

Boonkumklao, P., K, Parichart., and Assavanig, A. 2006. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus thermotolerans*, a novel species isolated from chicken feces. Online: (http://www.lib.ku.ac.th/KUCONF/KC4405054.pdf)

Burns, A. J. and Rowland, I. R. 2000. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. Curr. Issues Intest. Microbiol. 1: 13-24.

Buydens, P. and Debeuckelaere, S. 1996. Efficacy of SF 68 in the treatment of acute diarrhea. A placebo-controlled trial. Scand. J. gastroenterol. 31: 887– 891.

Carina, A. M., Oliver, G. and Apella, M.C. 2000. Protective effect of Enterococcus faecium J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with Salmonella Pullorum. J Food Prot. 63(10): 1333-7.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2007. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth Informational Supplement. Document M100-S17. 27(1): 52-55.

De, S., Van, H. L., Vande, W. M., Christiaens, H. and Verstracte, W. 1995. Significance of bile salt hydrolytic activities of Lactobacilli. J. Appl. Bacteriol. 78: 292-301.

Driessen A. J. M., Hooven HW, Kuiper W, Kamp M, Sahl H-G, Konings RNH & Konings WN. 1995. Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipids vesicles. Biochemistry 34: 1606-1614.

Euzéby, P. 2006. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature - Genus *Enterococcus*. Online: (http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html#r) .

Ehrmann, M. A., Kurzak, P., Bauer, J., and Vogel, R.F. 2002. Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. J. Appl. Microbiol. pp. 966-975.

Ezaki, T., Hashimoto, Y., and Yabuuchi, E. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. Int. J. Syst. Bacteriol., 39: 224-229.

FAO/W. H. O. 2001. Report on joint FAO/W. H. O. expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Online: http://www.who.int/fsf/probiotics.htm.

Franz, C., Holzapfel, W. H. and Stiles, M. E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? Int. J. Food Microbiol. 47: 1-24.

Franz, C. M., Stiles M. E., Schleifer K. H., and Holzapfel W. H. 2003. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. Int. J. Food Microbiol. 88: 105-22.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66: 365-378.

Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J. M., and Hugas, M. 1998. Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. J. Appl. Microbiol. 84: 125-132.

Gilliland, S. E., Nelson, C. R. and Maxwell, C. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus.* Appl. Environ. Microbiol. 49: 377-381.

Howard, J. C., Heinemann, C., Thatcher, B. J., Martin, B., Siang Gan, B. and Reid, G. 2000. Identification of collagen-binding proteins in Lactobacillus spp. With surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight proteinchip technology. Appl. Environm. Microbiol. 68: 4396-4400.

International Organization for Standardization (ISO). 1999. ISO 6887-1: Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. International Organization for Standardization Geneva, Switzerland.

Jin L. Z., Marquardt, R. R. and Zhao, X. 2000. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. Appl. Environ. Microbiol. 66*:* 4200-4204.

Jin, S. H., Corless, A. and Sell, J. L. 1998. Digestive system development in post-hatch poultry. J. Worlds Poult Sci. 54: 335-345.

Kariyama, R., Mitsuhata, R., Chow, J. W., Clewell, D. B. and Kumon, H. 2000. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. J. Clin. Microbiol. 38: 3092-3095.

Ketkaew, W., Assavanig, A. and Boonkumklao P. 2005. Production of bacteriocin by *Enterococcus faecium* HF84 from human gastro-intestinal tract. 31st Congress on

Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October. pp 1-3.

Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 39-86.

Klare, I., Konstabel, C., Badstübner, D., Werner, G. and Witte, W. 2003. Occurrence and spread of antibiotic resistance in *Enterococcus faecium*. Int. J. Food Microbiol. 88: 269-290.

Kullen, M. J. and Klaenhammer, T. R. 1999. Identification of the pH-inducible, proton-translocating F_1F_0-ATPase (*atpBEFHAGDC*) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization. Mol. Microbiol. 33: 1152-1161.

Kobayashi, H., Suzuki, T., Kinoshita, N., and Unemoto, T. 1984. Amplification of the *Streptococcus faecalis* proton-translocating ATPase by a decrease in cytoplasmic pH. J. Bacteriol. 158:1157-1160.

Koebmann, B. J., Nilsson, D., Kuipers, O. P. and Jensen, P. R. 2000. The membrane-bound H^+-ATPase complex is essential for growth of *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. 182: 4738-4743.

Laukava, A., Guba, P., Nemcova, R. and Vaslikova, Z. 2003. Reduction of Salmonella in gnotobiotic Japanese quails caused by the enterocin A-producing EK 13 strain of *Enterococcus faecium*. Vet. Res. Comm. 27: 275-280.

Lewenstein, A., Frigerio, G. and Moroni, M. 1979. Biological properties of SF68, a new approach for the treatment of diarrhoeal diseases. Curr. Ther. Res. 26: 967.

Lilly, D. M. and Stillwell, R. H. 1965. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. Science. 147: 747-748.

Lindsey, T. O. 1990. Further studies into the mode of action of growth promotants in turkeys. Proc. Of the SmithKline Animal Health Products Oacesetter Conf. STAFAC (virginiamycin) for Turkeys, Tan. San Diego, CA, USA. pp 1-10.

Lorca, G., Torino, M. I., Font de Valdez, G. and Ljungh, A. 2002. Lactobacilli express cell surface proteins which mediate binding of immobilized collagen and fibronectin. FEMS Microbiol. Lett. 206: 31-37.

Marciñáková, M., Simonová, M. and Lauková, A. 2004. Probiotic Properties of *Enterococcus faecium* EF9296 Strain Isolated from Silage. ACTA. VET. BRNO. 73: 513–519.

Marteau, P., Pochart, P., Flouri, B., Pellier, P., Santos, L., Desjeux, J. F. and Rambaud, J. C. 1990. Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. Am. J. Clin. Nutr. 52: 685-688.

McDonald, L.C., Fleming, H. P. and Hassan, H.M. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2120-2124.

McConnell, M. A. and Tannock, G. W. 1991. Lactobacilli and azoreductase activity in the murine cecum. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3664-3665.

Misty Noble. 2006. Biomaterials Tutorial – Biofilms. Online: http://www.uweb.engr.washington.edu/research/tutorials/biofilm.

Moser, S. A and Savage, D. C. 2001. Bile salt hydrolase activities and resistance of toxicity of conjugated bile salt are unrelated properties in Lactobaculli. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3476-3480.

Naaber, P., Smidt, I., Stsepetova, J., Brilene, T., Annuk, H. and Mikelsaar, M. 2004. Inhibition of *Clostridium difficile* strains by intestinal Lactobacillus species. J. Med. Microbiol. 53: 551-554.

Nes, I. F., Diep, D. B. and Holo, H. 2007. Bacteriocin Diversity in Streptococcus and Enterococcus. J. Bacteriol. 189: 1189-1198.

Ocaña, V.S., De Ruiz Holgado, A. A. and Nader-Macías, M. E. 1999. Growth inhibition of Staphylococcus aureus by H_2O_2-producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 23(2): 87-92.

Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P. and Socclo, C. R. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. Braz. arch. biol. technol. 50(3): 512-542.

Paulsen, I. T. 2004. Genome sequence of a vancomycin resistant pathogen. Biomedicine & Pharmacotherapy. 58: 268-270.

Peter, A. S., Nicholas, S. M., Elisabeth, M. S. and John G. H. 1986. Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, U.S.A. 2: 1063-1065.

Pollman, D. S., Danielson, D. M. and Peo, E. R. 1980. Effect of microbial feed additive on performance of starter and growing-finishing pigs. J. Anim. Sci. 51: 577-581.

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.

Rossi, E. A., Vendramini, R. C., Carlos, I. Z., Pei, Y. C. and De Valdez, G.F. 1999. Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. European Food Research and Technology. 209: 305-307.

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matta, J. and Mattila-Sand-holm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety functional and technological properties. J. Biotechnil. 84: 197-215.

Sanders, M. E. and Veld, J. H. 1999. Bringing a probiotic containing functional food to the market: microbiological, product regulatory and labeling issues. Antonie van Leeuwenhoek. 76: 293-315.

Samir, A., Margarita, G., Marta, H., Mercedes, M., Manuel, M., Antonio, G. and Eva, V. 2005. Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. Int. J. Food Microbiol. 103: 179-190.

Schleifer and Kilpper-Ba/lz. 1984. "Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus Enterococcus nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov". Int. J. Syst Bacteriol. 34: 31-34.

Schlesinger, M. J. 1990. Heat shock proteins. J. Biol. Chem. 265 (21): 12111-12114.

Schillinger, U., and Lücke, F. K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus* sake isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1901-1906.

Strompfová, V., Lauková, A. and Ouwehand, A. C. 2004. Selection of enterococci for potential canine probiotic additives .Vet. Microbiol. 100: 107-114.

Strus, M., Marewicz, E., Kukla, G., Ruranska-Smutnicka, D., Przondo-Mordarska, A. and Heczko, P. B. 2001. Surface properties of *Lactobacillus* strains of human origin. Microb. Ecol. Health Dis. 13: 240-245.

Strus, M., Kucharska, A., Kukla, G., Brzychczy-Włoch, M., Maresz, K. and Heczko, P. B. 2005. The in vitro activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against Candida. Infect. Dis. Obstet. Gynecol. 13(2): 69-75.

Sturkie, P. D. 1976. Avian physiology. Springer-Verlag, Berlin. 400 pp.

Styriak, I., Laukova, A. and Ljungh, A. 2002. Lectin-like binding and antibiotic sensitivity of enterococci from wild herbiovores. Microbiol. Res. 157: 293-303.

Sukontasing S., Tanasupawat, S., Moonmangmee, S., Lee, J-S. and Suzuki, K-I. 2007. *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57: 2151-2154.

Švec, P., Vancanneyt, M., Sedláček, I., Naser, S. M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B. and Swings, J. 2006. *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56: 577-581.

Tanasupawat, S., Sukontasing, S. and Lee, J. S. 2008. *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage (mum) in Thailand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58 (2): (in press)

Taranto, M.P., Medici, M., Perdigon, G., Ruiz Holgado, A.P., and Valdez, G.F. 1998 Evidence for hypocholesterolemiceffect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. J. Dairy. Sci. 81: 2336-2340.

Tamaoka, J. and Komagata, K. 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. FEMS Microbiol. Lett. 25: 125-128.

The national independent regulator of pesticides and veterinary medicines, Australian Government. 2001. Guidelines for the registration of direct fed microbial products. Online: http://www.apvma.gov.au/guidelines/gl9_microbial.shtml

Tuomola, E. M., Ouwehand, A. C. and Salminen, S. J. 1999. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. FEMS. Immunol. Med. Microbiol. 26(2): 137-42

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. and Truper, H. G. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int. J. Syst. Bacteriol. 37: 463-464.

Wunderlich, P. F., Braun, L., Fumagalli, I., D'Apuzzo, V., Heim, F., Karly, M., Lodi, R., Politta, G., Vonbank, F. and Ja Zeltner, L., 1989. Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing Enterococcus SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. J. Int. Med. Res. 17: 333-338.

Zacconi, C., Bottazzi, V., Ribecchi, A., Bosi, E., Sarra, P. G., and Tagliaferro, L. 1992. Serum cholesterol levels in axenic mice colonised with *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*. Microbiologica. 5: 413-418.

Zalán, Z., Edina, N., Ágnes, B. and Anna, H. 2005. Influence of Growth Medium on Hydrogen Peroxide and Bacteriocin Production of *Lactobacillus* Strains. Food Technol. Biotechnol. 43: 219-225.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมีและยาต้านจุลชีพ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Bile Esculin Azide agar

Meat extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Bile	40	กรัม
Ferric citrate	0.5	กรัม
Esculin	1	กรัม
Agar	15	กรัม
Sodium azide	0.4	กรัม
DDW	1	ลิตร

ปรับ pH 7.2 $\pm$ 1

1.2 Brain heart infusion agar/broth

Brain extract	7.8	กรัม
Heart extract	9.7	กรัม
Peptone	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Sodium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
Dextrose	2	กรัม
Agar	15	กรัม
DDW	1	ลิตร

ปรับ pH 7.2 $\pm$ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 Kenner Fecal (KF) agar/broth

Proteose peptone	10	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Sodium glycerol phosphate	10	กรัม
Glucose	10	กรัม
Lactose	1	กรัม
Sodium azide	0.4	กรัม
Bromocresal purple	0.06	กรัม
Agar	15	กรัม
DDW	1	ลิตร

ปรับ pH 7.2 $\pm$ 1

1.4 Mueller Hinton (MH) agar

Peptone	17.5	กรัม
Beef infusion solids	4	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	15	กรัม
DDW	1	ลิตร

ปรับ pH 7.2 $\pm$ 1

1.5 MRS agar/broth/soft

Proteose peptone	10	กรัม
Meat extract	8	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Glucose	20	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Triammonium citrate	2	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2	กรัม
Polysorbate 80	1	กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Agar	14	กรัม
DDW	1	ลิตร

ปรับ pH 6.2 $\pm$ 1

2. สารเคมี

1. สารละสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2 solution)
2. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
4. กรดอะมิโนอาร์จินีน (Arginine)
5. น้ำตาลซูโครส (Sucrose)
6. น้ำตาลแมนนิทอล (Manitol)
7. น้ำตาลอะราบิโนส (Arabinose)
8. น้ำตาลราฟฟิโนส (Raffinose)
9. น้ำตาลซอบิทอล (Sorbitol)
10. น้ำตาลแลตโตส (Lactose)
11. สารละลายแฮงบาลานส์ (Hank balance solution)
12. โปรตีเนส เค (Proteinse K)
13. ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs;A, C, G, T)
14. กรดอีโทนีไดอะไมน์ เตตราอะซิติก (Ethoenediamine tetraacetic acid (EDTA))
15. เอดทิเดียม โบรไมด์ (Ethidium bromide)
16. กลีเซอรอลสำหรับ พีซีอาร์ (Glycerol for PCR)
17. มาร์คเกอร์ (Low ladder marker)
18. อะกาโรส (agarose)
19. พร้ามเมอร์ (Oligonuecleotide primer)
20. เอนไซม์ แทก ดีเอนเอ โพลีเมอเรส (Tag DNA polymerase)
21. ทริส เบส (Tris-base)
22. ไตรฟีนิลเทตราโซเลียมคลอไรด์ (2,3,5 - Triphenyltetrazolium chloride)

3. ส่วนประกอบของสารเคมีสำหรับการสกัด DNA และสำหรับ PCR

3.1 1.5% Agarose gel

Agarose	0.3	กรัม
0.5 x TBE buffer	20	มิลลิลิตร

3.2 dNTP mixture, 300 µl (10 mM)

dATP, 100 mM	30	ไมโครลิตร
dCTP, 100 mM	30	ไมโครลิตร
dGTP, 100mM	30	ไมโครลิตร
dTTP, 100mM	30	ไมโครลิตร
DDW	180	ไมโครลิตร

3.2 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Disodium ethylene diamine tetraacetate.$2H_2O$	186.12	กรัม
DDW	800	มิลลิลิตร

3.3 DNA Ladder marker

DNA ladder marker	20	ไมโครลิตร
DDW	40	ไมโครลิตร

3.4 Ethidium bromide (10 mg/ml)

Ethidium bromide	1	กรัม
DDW	100	มิลลิลิตร

3.5 Loading dye

Bromphenol blue	0.25	กรัม
Xylene cyanol	0.25	กรัม
Ficoll 400	15	กรัม
Sterilized water	100	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 10 x Tris-borate-EDTA (TBE) buffer, 500 ml

Tris base	30.25	กรัม
Boric acid	15.425	กรัม
Na_2 EDTA.$2H_2O$	1.86	กรัม
Sterilized water	500	มิลลิลิตร
0.5 x TE buffer	500	มิลลิลิตร
10 x TE buffer	25	มิลลิลิตร
Sterilized water	475	มิลลิลิตร

3.7 10 x Tris/HCl-EDTA (TE) buffer

Tris base	12.11	กรัม
0.5 M EDTA	20	มิลลิลิตร
1 x TE buffer	500	มิลลิลิตร
10 x TE buffer	50	มิลลิลิตร
Sterilized water	450	มิลลิลิตร

4. ส่วนประกอบของสารเคมีสำหรับ DNA – DNA Hybridization

4.1 2M H_2SO_4

Conc. H_2SO_4	2	มิลลิลิตร
Distilled water	34	มิลลิลิตร

4.2 Phenol:chloroform (1:1)

ทำการละลายผลึก phenol ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาผสมกับ chloroform ในอัตราส่วน 1:1 เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

4.3 Saline-EDTA buffer (pH 8)

NaCl	0.1	โมล
ESTA.2Na (pH 8)	50	มิลลิโมล

4.4 10% Sodium dodecyl sulphate (SDS)

Conc. H_2SO_4	2	มิลลิลิตร
Distilled water	34	มิลลิลิตร

4.5 0.1M Tris NaCl (pH 9)

Tris	1.21	มิลลิกรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบมาผสมกันแล้วปรับ pH ให้เป็น 9 ด้วย HCl

4.6 10X SSC (saline sodium citrate)

NaCl	1.5	โมล
Tris-sodiumcitrate	0.1	โมล

4.7 RNase T_1 solution

RNase T_1	80	ไมโครลิตร
0.1M Tris-HCl	10	มิลลิลิตร

ละลาย RNase T_1 จำนวน 20 mg ลงใน 0.15M NaCl จำนวน 10 mL แล้วนำไปต้ม 95 องศาเซลเซียส นาน 5 – 10 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.8 2X Phosphate buffer saline (PBS)

$NaHPO_4$	8	มิลลิโมล
K_2HPO_4	1.5	มิลลิโมล
NaCl	137	มิลลิโมล
KCl	2.7	มิลลิโมล

4.9 Prehybridization solution

100XDenhardt solution	5	มิลลิลิตร
10 mg/mL dalmon sperm DNA	1	มิลลิลิตร
20XSSC	10	มิลลิลิตร
Formamide	50	มิลลิลิตร
Distilled water	34	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.10 Hybridization solution

Prehybridization solution	100	มิลลิลิตร
Dextran sulfate	5	มิลลิลิตร

4.11 solution I

Bovine serum albumin (Fraction V)	0.25	กรัม
Triton X-100	50	ไมโครลิตร
PBS	50	ไมโครลิตร

4.12 solution II

Streptavidin-POD	1	ไมโครลิตร
Solution I	4	ไมโครลิตร

4.13 solution III

3,3,5,5- Tetramethylbenzidine (TMB)	100	ไมโครลิตร
0.3% H_2O_2	100	ไมโครลิตร
0.4 M Citric acid + 0.2 M Na_2HPO_4 buffer pH 6.2 in 10% DMSO		

5. ยาต้านจุลชีพ

5.1 Amoxycillin+Clavulanic acid 20+10 µg	(Oxoid,U.S.A.)
5.2 Ampicillin 10 µg	(Oxoid,U.S.A.)
5.3 Cefotaxime 30 µg	(Oxoid,U.S.A.)
5.4 Ciprofloxacin 5 µg	(Oxoid,U.S.A.)
5.5 Chloramphenical 30 µg	(Oxoid,U.S.A.)
5.6 Gentamycin 10 µg	(Oxoid,U.S.A.)
5.7 Erythromycin 15 µg	(Oxoid,U.S.A.)
5.8 Trimethoprim+Sulphamethoxazole 1.25+23.75 µg	(Oxoid,U.S.A.)
5.9 Tetracyclin 30 µg	(Oxoid,U.S.A.)
5.10 Vancomycin 30 µg	(Oxoid,U.S.A.)
5.11 Trimethoprim 5 µg	(Oxoid,U.S.A.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6 การทดสอบทางชีวเคมี

6.1 การทดสอบการติดสีแกรมส์

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงบนแผ่นสไลด์ นำไปผ่านเปลวไฟ 2 – 3 ครั้ง ย้อมสีด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีออกด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีนทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ล้างสีออกด้วยแอลกอฮอล์ 95% นาน 10 วินาที ย้อมทับด้วยสารละลาย safranin O นาน 30 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจดู รูปร่างของเซลล์ การเรียงตัว และการติดสีแกรมส์ ด้วยกล้องจุลทรรศ์กำลังขยาย 100 เท่า

6.2 ทดสอบการสร้างเอ็นไซม์คะตะเลส

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่เลี้ยงไว้ 24 ชั่วโมง เขี่ยลงบนแผ่นสไลด์ หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 3% จำนวน 2 – 3 หยด เชื้อที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสจะเห็นเป็นฟองอากาศฟู่ออกมาจากโคโลนีของเชื้อ โดยใช้ *Bacillus subtillis* เป็นเชื้อควบคุมซึ่งจะให้ผลเป็นบวก

6.3 ความสามารถในการเจริญเติบโตที่ 45 องศาเซลเซียส

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบจะพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น

6.4 ความสามารถในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือ 6.5%

ทดสอบการใช้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์ 6.5% แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบจะพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น

6.5 การทดสอบ arginine hydrolysis และการสร้างกรดจาก sucrose, mannitol, arabinose, raffinose, sorbitol และ lactose

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีส่วนผสมของ arginine และน้ำตาล sucrose, mannitol, arabinose, raffinose, sorbitol และ lactose ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง กรณีของเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ arginine hydrolysis จะพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี ส่วนเชื้อที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบการใช้น้ำตาลต่างๆ จะพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลือง

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 20 Total Viable Count (log_{10} CFU/gm) ของ *Enterococcus* จากตัวอย่างกระเพาะพักของไก่พื้นเมือง

กระเพาะพักของไก่พื้นเมือง (n=30)	Total Viable Count (log_{10} CFU/gm) ของ *Enterococcus*
1	7.44
2	7.43
3	7.75
4	7.61
5	8.68
6	7.59
7	7.49
8	7.04
9	8.66
10	8.32
11	7.78
12	7.20
13	7.25
14	7.50
15	7.90
16	8.25
17	7.47
18	7.11
19	7.36
20	7.34
21	7.14
22	7.27
23	7.07
24	7.43
25	7.23
26	7.17
27	7.32
28	7.11
29	7.11
30	7.34

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 21 Total Viable Count (log_{10} CFU/gm) ของ *Enterococcus* จากตัวอย่างลำไส้เล็กส่วนต้นของไก่พื้นเมือง

ลำไส้เล็กส่วนต้นของไก่พื้นเมือง (n=30)	Total Viable Count (log_{10} CFU/gm) ของ *Enterococcus*
1	7.14
2	7.27
3	7.07
4	7.43
5	7.23
6	7.07
7	7.43
8	8.23
9	8.43
10	7.44
11	7.43
12	8.75
13	7.61
14	7.68
15	7.59
16	7.49
17	7.04
18	7.66
19	7.78
20	7.20
21	7.25
22	7.50
23	7.90
24	7.25
25	7.47
26	7.11
27	7.36
28	7.34
29	7.14
30	7.25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 22 Total Viable Count (log_{10} CFU/gm) ของ *Enterococcus* จากตัวอย่างลำไส้เล็กส่วนปลายของไก่พื้นเมือง

ลำไส้เล็กส่วนปลายของไก่พื้นเมือง (n=30)	Total Viable Count (log_{10} CFU/gm)ของ *Enterococcus*
1	7.68
2	7.59
3	8.49
4	7.04
5	7.66
6	7.78
7	7.20
8	8.25
9	7.50
10	8.23
11	7.07
12	7.43
13	7.23
14	7.43
15	7.44
16	7.43
17	7.75
18	7.61
19	7.68
20	7.59
21	7.49
22	7.68
23	7.59
24	7.49
25	7.04
26	7.66
27	7.32
28	7.78
29	7.20
30	7.25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 23 คุณสมบัติของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง

Characteristics	isolates									
	EFMC1	EFMC2	EFMC3	EFMC4	EFMC5	EFMC6	EFMC7	EFMC8	EFMC9	EFMC10
Shape	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci
Catalase reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 6.5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid from										
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* +, positive; - negative

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 24 คุณสมบัติของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง (ต่อ)

Characteristics	isolates									
	EFMC11	EFMC12	EFMC13	EFMC14	EFMC15	EFMC16	EFMC17	EFMC18	EFMC19	EFMC20
Shape	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci
Catalase reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 6.5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid from										
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* +, positive; - negative

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 25 คุณสมบัติของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง (ต่อ)

Characteristics	isolates									
	EFMC21	EFMC22	EFMC23	EFMC24	EFMD25	EFMD26	EFMD27	EFMD28	EFMD29	EFMD30
Shape	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci
Catalase reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 6.5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid from										
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* +, positive; - negative

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 26 คุณสมบัติของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง (ต่อ)

Characteristics	isolates									
	EFMD31	EFMD32	EFMD33	EFMD34	EFMD35	EFMD36	EFMD37	EFMD38	EFMD39	EFMD40
Shape	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci
Catalase reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 6.5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid from										
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* +, positive; - negative

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 27 คุณสมบัติของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง (ต่อ)

Characteristics	isolates									
	EFMD41	EFMI42	EFMI43	EFMI44	EFMI45	EFMI46	EFMI47	EFMI48	EFMI49	EFMI50
Shape	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci
Catalase reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 6.5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid from										
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* +, positive; - negative

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 28 คุณสมบัติของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง (ต่อ)

Characteristics	isolates									
	EFMI51	EFMI52	EFMI53	EFMI54	EFMI55	EFMI56	EFMI57	EFMI58	EFMI59	EFMI60
Shape	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci	cocci
Catalase reaction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 6.5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid from										
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* +, positive; - negative

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 29 อัตราการอยู่รอดของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองในการทนต่อกรด (pH 2.0) ปริมาณของ *E. faecium* เริ่มต้นคือ $1.5x10^8$ CFU/mL

สายพันธุ์	ปริมาณของเซลล์ที่เหลืออยู่		
	(CFU/mL)	Log_{10} (CFU/mL)	(%)
EFMC 2	$2.8x10^5$	5.44	66.5
EFMC17	$2.7x10^6$	6.43	78.6
EFMC 21	$5.7x10^6$	6.75	82.5
EFMC 22	$4.1x10^5$	5.61	68.6
EFMC 24	$4.8x10^6$	6.68	81.7
EFMD 25	$3.9x10^6$	6.59	80.6
EFMD 29	$3.1x10^5$	5.49	67.1
EFMD 30	$1.1x10^6$	6.04	73.8
EFMD 32	$4.6x10^5$	5.66	69.2
EFMI 42	$2.1x10^6$	5.32	65
EFMI 44	$6.1x10^5$	5.78	70.7
EFMI 46	$1.6x10^5$	5.20	63.6
EFMI 47	$1.8x10^6$	6.25	76.4
EFMI 49	$3.2x10^6$	6.50	79.5
EFMI 54	$8.0x10^5$	5.90	72.1
EFC	$1.8x10^5$	5.25	64.2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 30 ความสามารถในการทนต่อน้ำดี (bile) ที่ 1 ชั่วโมง ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง

สายพันธุ์	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Log_{10}CFU/mL)	ปริมาณเชื้อลดลง (Log_{10} CFU/mL)	การอยู่รอดของเชื้อ (%)
EFMC 2	5.44	1.47	27.0
EFMC17	6.43	4.11	63.9
EFMC 21	6.75	5.36	79.4
EFMC 22	5.61	1.34	23.9
EFMC 24	6.68	5.14	77.0
EFMD 25	6.59	4.27	64.8
EFMD 29	5.49	1.07	19.5
EFMD 30	6.04	5.43	89.9
EFMD 32	5.66	1.23	21.7
EFMI 42	5.32	1.17	22.0
EFMI 44	5.78	1.32	22.8
EFMI 46	5.20	1.11	21.4
EFMI 47	6.25	4.11	65.8
EFMI 49	6.50	5.34	82.2
EFMI 54	5.90	1.17	19.8
EFC	5.25	1.00	19.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 31 ความสามารถในการทนต่อน้ำดี (bile) ที่ 2 ชั่วโมง ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง

สายพันธุ์	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Log_{10}CFU/mL)	ปริมาณเชื้อลดลง (Log_{10}CFU/mL)	การอยู่รอดของเชื้อ (%)
EFMC17	6.43	2.32	36.1
EFMC 21	6.75	4.30	63.7
EFMC 24	6.68	1.25	18.7
EFMD 30	6.04	4.32	71.5
EFMI 47	6.25	1.47	23.5
EFMI 49	6.50	3.30	50.8

ตารางที่ 32 ความสามารถในการทนต่อน้ำดี (bile) ที่ 3 ชั่วโมง ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง

สายพันธุ์	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Log_{10}CFU/mL)	ปริมาณเชื้อลดลง (Log_{10}CFU/mL)	การอยู่รอดของเชื้อ (%)
EFMC 21	6.75	4.32	62.7
EFMD 30	6.04	4.36	71.2
EFMI 47	6.25	1.35	21.3
EFMI 49	6.50	2.46	38.5

ตารางที่ 33 ความสามารถในการทนต่อน้ำดี (bile) ที่ 4 ชั่วโมง ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง

สายพันธุ์	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Log_{10}CFU/mL)	ปริมาณเชื้อลดลง (Log_{10}CFU/mL)	การอยู่รอดของเชื้อ (%)
EFMC 21	6.75	2.35	35.7
EFMD 30	6.04	2.64	43.7
EFMI 47	6.25	1.40	21.9
EFMI 49	6.50	1.38	20.6

ตารางที่ 34 ประสิทธิภาพการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ ของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 1.5x10^8 CFU/mL

สายพันธุ์	ปริมาณเชื้อจับเกาะ(log_{10}CFU/mL)				ค่าเฉลี่ย	ปริมาณเชื้อจับเกาะ (%)
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 4		
EFMC 2	3.25	3.23	3.34	3.14	3.24	39.04
EFMC 17	3.89	3.11	3.62	2.69	3.33	40.09
EFMC 21	4.23	3.97	5.04	3.34	4.15	49.94
EFMC 22	4.16	3.04	3.23	3.27	3.43	41.27
EFMC 24	3.98	3.46	3.23	3.34	3.50	42.20
EFMD 25	3.36	3.25	4.56	3.25	3.61	43.43
EFMD 29	4.04	4.04	3.95	4.04	4.02	48.40
EFMD 30	3.62	3.65	3.00	3.64	3.48	41.90
EFMD 32	3.90	4.20	4.00	4.63	4.18	50.39
EFMI 42	4.30	3.34	3.60	2.95	3.55	42.74
EFMI 44	3.86	3.14	3.56	3.68	3.56	42.89
EFMI 46	3.96	5.07	4.04	4.07	4.29	51.63
EFMI 47	4.97	5.46	4.75	4.60	4.95	59.58
EFMI 49	4.65	4.61	4.69	4.44	4.60	55.39
EFMI 54	4.90	4.61	4.25	4.38	4.54	54.64
EFC	4.62	4.85	4.38	4.51	4.59	55.30
Salmonella Enteritidis*	3.41	3.44	3.38	3.55	3.45	41.51
*Bacillus subtillis***	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ *positive control ** negative control

ตารางที่ 35 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของ *E. faecium* แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากไก่พื้นเมือง

สายพันธุ์	ขอบเขตในการยับยั้ง (inhibition zone, mm)													
	E.coli				ค่าเฉลี่ย	*S.* Enteritidis				ค่าเฉลี่ย	*S.* Typhimurium				ค่าเฉลี่ย
จำนวนซ้ำ	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4	
EFMC 2	0	20	21	22	15.8	12	20	21	20	18.3	12	20	23	22	19.3
EFMC17	11	30	31	30	25.5	18	16	16	17	16.8	16	15	14	22	16.8
EFMC 21	10	30	29	29	24.5	12	15	14	15	14.0	10	16	15	22	15.8
EFMC 22	17	16	17	18	17.0	18	17	18	17	17.5	19	19	18	20	19.0
EFMC 24	17	20	21	20	19.5	15	24	24	23	21.5	12	24	22	22	20.0
EFMD 25	6	13	10	12	10.3	17	18	18	19	18.0	13	19	18	17	16.8
EFMD 29	16	20	22	21	19.8	19	20	19	20	19.5	10	27	22	22	20.3
EFMD 30	9	18	19	18	16.0	15	23	20	21	19.8	13	22	23	21	19.8
EFMD 32	8	22	21	22	18.3	16	22	20	21	19.8	11	21	20	23	18.8
EFMI 42	16	19	18	19	18.0	10	13	12	13	12.0	16	20	18	20	18.5
EFMI 44	15	12	11	13	12.8	14	20	20	19	18.3	12	22	20	21	18.8
EFMI 46	19	20	20	19	19.5	19	24	22	23	22.0	12	21	22	21	19.0
EFMI 47	16	20	20	19	18.8	12	20	21	24	19.3	16	21	20	19	19.0
EFMI 49	18	15	16	14	15.8	12	14	15	14	13.8	13	23	23	24	20.8
EFMI 54	18	20	19	20	19.3	12	14	15	16	14.3	13	20	15	20	17.0
EFC	17	24	23	24	22.0	15	23	20	23	20.3	10	22	22	24	19.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางนภาพร เลิศวรปรีชา เกิดเมื่อวันที่ 15 มีนาคม 2522 จังหวัดนครพนม จบการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยาประยุกต์) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม ปีการศึกษา 2541 ปัจจุบันทำงานที่ศูนย์ติดตามการดื้อยาของเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ (ภายใต้ความร่วมมือขององค์การอนามัยโลก) คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย