

## สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากไก่มีชีวิตคละพันธุ์ ตัวอย่าง มูลสัตว์ ปลายน้ำจืดคละพันธุ์ อาหารหมักดองจากแหล่งต่างๆ และผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากต่างประเทศ จำนวน 30, 25, 15, 9 และ 1 ตัวอย่างตามลำดับ รวม 80 ตัวอย่าง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ได้แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสิ้น 216 ไอโซเลท สามารถจัดแบคทีเรียกรดแลคติกในเบื้องต้นออกได้เป็น 3 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากการย้อมสีแกรม ลักษณะรูปร่างของเซลล์ และการสร้างก๊ากจากกลูโคส คือ กลุ่มของแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างท่อน จำนวน 121 ไอโซเลท กลุ่มของแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างกลมเป็นคู่ และสายโซ่จำนวน 63 ไอโซเลท และกลุ่มของแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างกลมเรียงเป็นสี่เหลี่ยม จำนวน 32 ไอโซเลท และแยกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกของต่างประเทศ 3 ไอโซเลท จัดจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มของแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างท่อน จำนวน 2 ไอโซเลท กลุ่มของแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างกลม จำนวน 1 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 50 ไอโซเลท จาก 216 ไอโซเลทที่ได้จากตัวอย่าง และจากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกทั้งหมด 3 ไอโซเลท มาทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติกที่ประกอบด้วย การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ การทนกรด การทนน้ำดี การผลิตสารต้านจุลชีพ พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกจากตัวอย่างจำนวน 6 ไอโซเลท คือ C43-1, C72-1, F23-1, C70-2, C76-1 และ C80-2 และจากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก 3 ไอโซเลท คือ Fr-A, Fr-B และ Fr-C โดยทุกไอโซเลทต้านทานต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม cephalosporins (aztreonam), aminoglycosides (streptomycin), polypeptide (เฉพาะ colistin), quinolones (nalidixic acid) และยาต้านจุลชีพอื่นๆ (vancomycin) ยกเว้นไอโซเลท C70-2 และ Fr-C ที่ให้ผลไวต่อยา vancomycin แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถทนกรดได้ดีที่สุดคือสายพันธุ์ F23-1 มีอัตราการรอดชีวิตในสภาวะกรด pH 2.5 เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ และทุกไอโซเลท สามารถเจริญในน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3, 1 และ 4 เปอร์เซ็นต์ได้ และสามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบในกลุ่มก่อโรคได้หมดด้วยวิธี agar spot แต่ไม่ผลิตแบคทีเรียอินเมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกคัดเลือกที่แยกได้มาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อโดยการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ในการวิเคราะห์หมักนึ่งเซลล์ พบว่าไอโซเลท C72-1, F23-1 และ Fr-B มี meso-DAP แต่ไอโซเลท C43-1, C70-2, C76-1, C80-2, Fr-A และ Fr-C ไม่มี meso-DAP ในผนังเซลล์ และการศึกษาไอโซเมอร์ ของกรดแลคติกที่เชื้อผลิตว่าเป็น D-form หรือ L-form ผลการวิเคราะห์พบว่า เชื้อที่สร้างกรดแลคติกชนิด L มี 3 ไอโซเลท คือ

C43-1, C76-1 และ Fr-A และเชื้อที่สร้างกรดแลคติกชนิด DL มี 6 ส่วนไอโซเลท คือ C72-1, F23-1, C70-2 C80-2, Fr-B และ Fr-C

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการคัดเลือกมาจัดจำแนกโดยคุณสมบัติทางพีโนไทป์ และการหาลำดับเบส 16S rDNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) จากผลการทดสอบลักษณะทางพีโนไทป์ และความคล้ายคลึงของการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA พบว่า ไอโซเลท C43-1 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับ *L. salivarius* ATCC 11741<sup>T</sup> มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท C72-1, F23-1 และ Fr-B มีลำดับเบสใกล้เคียงและเปอร์เซ็นต์ความเหมือนแบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *L. plantarum* JCM 1149<sup>T</sup> เท่ากับ 97.8, 97.1 และ 96.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และไอโซเลท C70-2 และ Fr-C มีลำดับเบสใกล้เคียง *E. faecium* DSM 20477<sup>T</sup> มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99.1 เปอร์เซ็นต์เท่ากันทั้งสอง ไอโซเลท ส่วนไอโซเลท C76-1 มีลำดับเบสใกล้เคียง *E. hirae* LMG 6399<sup>T</sup> มี เปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.2 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท C80-2 มีลำดับเบสใกล้เคียง *P. pentosaceus* DSM 20336<sup>T</sup> มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.3 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลท Fr-A มีลำดับเบสใกล้เคียง และเปอร์เซ็นต์ความเหมือน *Lactobacillus casei* ATCC 334<sup>T</sup> เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 9 ไอโซเลท จัดจำแนกได้เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์ทางพีโนไทป์ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่ากลุ่มที่มีรูปร่างแท่ง (C43-1, C72-1, F23-1, Fr-A และ Fr-B) จัดเป็น *Lactobacillus salivarius*, *L. plantarum*, *L. plantarum*, *L. casei* และ *L. plantarum* ตามลำดับ กลุ่มที่มีรูปร่างทรงกลม (C70-2, C76-1 และ Fr-C) เป็น *Enterococcus faecium*, *E. hirae* และ *E. faecium* ตามลำดับ ส่วน C80-2 ใกล้เคียงกับ *Pediococcus pentosaceus*

ผลการเปรียบเทียบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างกับผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากต่างประเทศ โดยเปรียบเทียบแบคทีเรียกรดแลคติกในสปีชีส์เดียวกัน แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียกรดแลคติกในสกุล *Lactobacillus plantarum* โดย *L. plantarum* C72-1, *L. plantarum* F23-1 ที่คัดเลือกได้จากตัวอย่าง เปรียบเทียบกับ *L. plantarum* Fr-B ที่คัดเลือกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากต่างประเทศ และแบคทีเรียกรดแลคติกในสกุล *Enterococcus faecium* โดย *E. faecium* C70-2 ที่คัดเลือกได้จากตัวอย่าง เปรียบเทียบกับ *E. faecium* Fr-C ที่ได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้จากตัวอย่าง มีคุณสมบัติหรือมีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกได้ในห้องปฏิบัติการใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากต่างประเทศ

ผลจากการศึกษา สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกในสัตว์ได้ และไอโซเลทที่มีคุณสมบัติเหมาะสมแยกได้จากตัวอย่างไก่และปลาน้ำจืด เมื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้มีคุณสมบัติไม่ด้อยกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากโปรไบโอติกของต่างประเทศ ซึ่งจะนำไปสู่ประโยชน์สูงสุดโดยทดสอบใช้ในสัตว์เพื่อพัฒนาเป็นโปรไบโอติกที่มีศักยภาพสูงและนำไปใช้ได้จริงในอนาคต

### ข้อเสนอแนะ

จากการกำหนดการใช้สารเสริมชีวนะหรือโปรไบโอติก ในกฎหมายของประเทศไทย โดยประกาศของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2539 เรื่องกำหนดชื่อ ประเภท ชนิด หรือลักษณะของวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ที่ใช้ให้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์เพื่อขาย ตลอดจนอัตราส่วน หรือปริมาณที่ให้ใช้หรือห้ามไม่ให้ใช้วัตถุนั้นเกินกำหนด พ.ศ. 2539 ซึ่งออกตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ พ.ศ. 2525 ไม่ได้ระบุ หรืออนุญาตเชื้อ *Enterococcus hirae* และ *Lactobacillus salivarius* ไว้ในหมวดแบคทีเรียที่ใช้เป็นโปรไบโอติก ซึ่งในการนำแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้ไปใช้ทดสอบเป็นโปรไบโอติกต่อไปในอนาคต ดังนั้นไอโซเลท *Lactobacillus salivarius* C43-1 และ *Enterococcus hirae* C76-1 จึงไม่เหมาะสมในการนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์