การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกจากไก่เบตง

Screening of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria from Be-tong Chicken

สายใจ แก้วอ่อน[1*] และ ลักขณา รักขพันธ์[2]

Saichai Kaew-on[1*] and Lakkhana Rakkhaphan[2]

Received: 11 May 2018, Revised: 5 July 2018, Accepted: 23 November 2018

บทคัดย่อ

ความปลอดภัยของอาหารเป็นสิ่งที่สำคัญมาก เพื่อหลีกเลี่ยงผลเสียที่เกิดจากการใช้สารปฏิชีวนะและสารเร่งการเจริญเติบโต โปรไบโอติกจึงถูกนำมาใช้ในการเลี้ยงสัตว์เศรษฐกิจรวมถึงไก่ด้วย งานวิจัยนี้จึงศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลกติกจำนวน 145 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากกระเพาะพัก ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ของไก่เบตง การคัดเลือกเบื้องต้นโดยใช้คุณสมบัติการทนกรด พบ 22 ไอโซเลท ทนต่อกรดพีเอช 2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าร้อยละ 50 เมื่อนำแบคทีเรียเหล่านี้ไปบ่มในระบบกระเพาะอาหารและลำไส้จำลองพบ 13 ไอโซเลท ได้แก่ F/Cr 01007, F/Cr 01008, A/Cr 04002, A/Si 04001, A/Si 04002, A/Si 04014, A/Si 04015, S/Si 04024, A/Li 04008, A/Li 05011, F/Si 06001, A/Cr 07010 และ A/Li 07003 มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 51.66-88.59 จากนั้นศึกษาความไม่ชอบน้ำเพื่อบ่งชี้การเกาะติดลำไส้ของเซลล์เซอร์เฟส พบ 11 ไอโซเลท มีผลบ่งชี้การเกาะติดลำไส้มากกว่าร้อยละ 90.28 และ 82.89 ในไซลีนและทูลูอีน ตามลำดับ เมื่อทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะพบว่าไอโซเลทที่แสดงคุณสมบัติเด่นในด้านความสามารถรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารจำลองและเซลล์เซอร์เฟสมีความไม่ชอบน้ำสูง ต้านทานสารปฏิชีวนะจำนวน 5-9 ชนิด คือ F/Cr 01007, A/Si 04002, S/Si 04024, A/Li 04008, A/Li 05011, F/Si 06001 และ A/Cr 07010 เมื่อวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 7 ไอโซเลทนี้ โดยเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสใน 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีความคล้ายคลึง *Lactobacillus reuteri* ร้อยละ 99 ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus reuteri* ที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารของไก่เบตงสามารถนำไปพัฒนาใช้เป็นโปรไบโอติกได้

คำสำคัญ: โปรไบโอติก, แบคทีเรียแลกติก, ไก่เบตง

---

[1] สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80240

[1] Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Tungyai, Nakorn Sri Thammarat 80240, Thailand.

[2] สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา อำเภอเมือง จังหวัดยะลา 95000

[2] Department of Biology, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University, Muang, Yala 95000, Thailand.

[*] ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): saijai.k@rmutsv.ac.th Tel: 08 9893 5522

ABSTRACT

Food safety is very important. In order to avoid undesirable results of antibiotics and growth promoting agents, probiotic has been used in economic animals including poultry husbandry. This research studied the probiotic properties of 145 strains of lactic acid bacteria (LAB) isolated from crop, small and large intestinal tract of Be-tong chicken. According to the primary screen method for acid tolerance, twenty-two isolates exhibited the acid tolerance with survival higher than 50% at pH 2 for 2 hours. These 22 strains were then incubated in simulated gastrointestinal tract. Thirteen strains including F/Cr 01007, F/Cr 01008, A/Cr 04002, A/Si 04001, A/Si 04002, A/Si 04014, A/Si 04015, S/Si 04024, A/Li 04008, A/Li 05011, F/Si 06001, A/Cr 07010 and A/Li 07003 showed the tolerance with survival ranging from 51.66 to 88.59%. Eleven strains had more over 90.28 and 82.89% hydrophobicity in xylene and toluene, respectively. The antibiotic resistance of these LAB showed that F/Cr 01007, A/Si 04002, S/Si 04024, A/Li 04008, A/Li 05011, F/Si 06001 and A/Cr 07010 had high survival under the simulated gastrointestinal tract and high cell surface hydrophobicity could tolerate to 5-9 antibiotics. These 7 strains were identified as *Lactobacillus reuteri* with the 99% similarity by 16S rDNA sequence analysis. This research study indicates that it is possible to use *Lactobacillus reuteri* from gastrointestinal tract of Be-tong chicken as effective probiotic.

Key words: probiotic, lactic acid bacteria, Be-tong chicken

บทนำ

ไก่เบตงเป็นไก่พันธุ์พื้นเมืองที่นิยมเลี้ยงกันในสามจังหวัดชายแดนใต้ ได้แก่ ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส (ปิ่น และคณะ, 2543) เป็นไก่ที่มีรสชาติอร่อย เนื้อนุ่ม มีไขมันน้อย กลิ่นหอมน่ารับประทานและปราศจากสารเร่งการเจริญเติบโต จึงเป็นที่นิยมบริโภคและเป็นที่ต้องการทั้งจากภายในประเทศและต่างประเทศ (มาเลเซีย และสิงคโปร์) ส่งผลให้ไก่เบตงมีราคาค่อนข้างสูง ปัจจุบันราคาไก่จากฟาร์มกิโลกรัมละ 350 บาท หรือไก่นึ่งแล้วสำหรับรับประทานกับข้าวมันไก่ราคาตัวละ 1,200-1,800 บาท ดังนั้นไก่เบตงจึงเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของท้องถิ่นในภาคใต้ตอนล่าง อย่างไรก็ตามในการเลี้ยงไก่อาจมีปัญหาการเกิดโรค เช่น โรคระบาดทางเดินหายใจ โรคนิวคาสเซิล อหิวาห์สัตว์ปีก และโรคฝีดาษ (สุมิตรา, 2550) วิธีแก้ปัญหานี้คือ การใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะและวัคซีน อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะอาจส่งผลให้เกิดการดื้อยาของจุลินทรีย์และการตกค้างของสารเคมีในเนื้อไก่ซึ่งจะส่งผลกระทบโดยตรงต่อผู้บริโภค ดังนั้นปัจจุบันการเลี้ยงสัตว์แบบอินทรีย์เพื่อเพิ่มคุณภาพของการผลิต โดยไม่ให้เกิดผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม สุขภาพสัตว์และผู้บริโภคจึงมีความต้องการมากขึ้น การใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกเพื่อส่งเสริมการเจริญและสร้างภูมิคุ้มกันในไก่จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ

จุลินทรีย์โปรไบโอติก (probiotic) คือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและเมื่อได้รับในปริมาณที่เหมาะสมจะส่งผลดีต่อสุขภาพของผู้ที่ได้รับหรือเจ้าบ้าน (host) (Shah, 2000) เนื่องจากโปรไบโอติกมีบทบาทในการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ผลิตเอนไซม์สำหรับย่อย

อาหารบางชนิด ส่งผลเพิ่มสารอาหารและการเจริญเติบโตของเจ้าบ้าน สร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Sieladie *et al.*, 2011) หลักในการคัดเลือกสายพันธุ์โปรไบโอติกนั้นเบื้องต้นพิจารณาจากการทนต่อกรด รวมถึงการมีชีวิตรอดอยู่ในกระเพาะอาหารและลำไส้ การยึดเกาะลำไส้ได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้แสดงถึงความสามารถในการรอดชีวิตและมีแนวโน้มยึดเกาะเซลล์เจ้าบ้านได้ดี สามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดี และเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในร่างกายเจ้าบ้าน (Balcázar *et al*., 2008) โปรไบโอติกที่นิยมส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียแลกติก เช่น *Lactobacillus* sp. และ *Bifidobacterium* sp. เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่ปลอดภัย (Generally recognized as safe: GRAS) (Klayraung *et al*., 2008) และเป็นโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพสูง ทั้งนี้แหล่งของจุลินทรีย์ก็มีความสำคัญ จุลินทรีย์ที่คัดแยกมาจากเจ้าบ้านที่จะนำกลับมาใช้เป็นโปรไบโอติกนั้นมีประโยชน์ในแง่ความจำเพาะในด้านระบบนิเวศของจุลินทรีย์กับเจ้าบ้าน (Sahu *et al*., 2008) โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกจากทางเดินอาหารไก่พบว่าเป็นชนิด *L. reuteri*, *L. salivarius* และ *L. crispatus* (Nitisinprasert *et al*., 2000; Taheri *et al*., 2009a; Heravi *et al*., 2011)

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกจากทางเดินอาหารของไก่เบตง เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับอนาคตในการนำแบคทีเรียชนิดที่มีความเป็นโปรไบโอติกไปใช้เสริมอาหารเพื่อเลี้ยงไก่เบตง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารของไก่เบตง

คัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากกระเพาะพัก ลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ของไก่เบตงพันธุ์แท้ อายุประมาณ 6 เดือน จากอำเภอเบตง จังหวัดยะลา โดยนำตัวอย่างมาแช่ในแอลกอฮอล์ร้อยละ 70 เป็นเวลา 30 วินาที 2 ครั้ง จากนั้นแช่ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง แล้วนำตัวอย่างปริมาณ 10 กรัม ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่น เป็นเวลา 1 นาที และเจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 แบบ ten-fold serial dilution ให้มีจำนวนแบคทีเรียที่เหมาะสม จากนั้นเกลี่ยบนอาหารแข็ง MRS (Difco, Detroit, MI, USA) ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (Scharlau Chemie, S.A.) ร้อยละ 0.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วนำไปบ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนแบคทีเรียสร้างกรดซึ่งมีโซนใสรอบโคโลนี แล้วสุ่มเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีลักษณะแตกต่างกันนำมา streak ลงบนอาหารแข็งชนิดเดิมอีก 2-3 ครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำโคโลนีที่ได้มาทดสอบการเป็นแบคทีเรียแลกติกโดยการย้อมสีแกรมและทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

2. การเตรียมแบคทีเรียแลกติกและทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติก

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกร้อยละ 5 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียแลกติกไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยฟอสเฟสบัฟเฟอร์ พีเอช 6

2.1 การทนต่อกรด

การทดสอบการทนต่อกรดดัดแปลงวิธีการมาจาก Taheri *et al.* (2009b) นำตะกอนเซลล์ที่ปั่นเหวี่ยงแล้วไปแขวนลอยในฟอสเฟสบัฟเฟอร์พีเอช 2 โดยใช้

กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปรับพีเอช นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตรอดหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยวิธีการ drop plate บนอาหารแข็ง MRS บ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ใน anaerobic jar และคำนวณอัตราการรอดชีวิต โดย อัตราการรอดชีวิต (%) = (log จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต หลังการทดสอบ (CFU/mL) × 100)/ log จำนวนเซลล์ เริ่มต้น (CFU/mL) การรายงานผลอ้างอิงตามวิธีของ Lertworapreecha *et al*. (2011)

2.2 การมีชีวิตรอดภายใต้สภาวะระบบกระเพาะอาหารและลำไส้จำลอง

นำแบคทีเรียแลกติกที่ปั่นเหวี่ยงแล้วไปแขวนลอยในน้ำย่อยกระเพาะอาหารสังเคราะห์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 ที่มีเปปซิน (Sigma, Basingstoke, Hampshire, UK) 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก นับจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นโดยวิธี drop plate จากนั้นนำแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำย่อยสังเคราะห์ไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตรอดในกระเพาะอาหารจำลอง นำแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำย่อยสังเคราะห์นี้ไปปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทน้ำย่อยสังเคราะห์ทิ้ง และแทนที่ด้วยของเหลวในลำไส้จำลอง ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยแพนครีเอติน (Sigma, Basingstoke, Hampshire, UK) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเกลือน้ำดี (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) ร้อยละ 1.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับพีเอชเป็น 8 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ นับจำนวนแบคทีเรียก่อนและหลังนำไปบ่มในเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วคำนวณอัตราการรอดชีวิตตามวิธีในข้อ 2.1

2.3 ความไม่ชอบน้ำของเซลล์เซอร์เฟส

ความไม่ชอบน้ำของเซลล์เซอร์เฟส (cell surface hydrophobicity) ทดสอบโดยดัดแปลงวิธีของ Taheri *et al*. (2009a) นำแบคทีเรียแลกติกไปปั่นเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง และปรับความเข้มข้นของเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 ให้มีความขุ่น 0.5 โดยวัดความขุ่นด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Biochrom, Libra S12) ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) และนำไปใส่ในหลอดทดลองๆ ละ 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติมทูลูอีน (toluene, Panreac Quimica SAU, Barcelona, Espana) และไซลีน (xylene, Panreac Quimica SAU, Barcelona, Espana) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในเซลล์แขวนลอย ผสมให้เข้ากันโดย vortex เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นวางไว้ 15 นาที เพื่อให้เกิดการแยกชั้น วัดความขุ่น OD_{600} คำนวณความไม่ชอบน้ำของเซลล์เซอร์เฟส ตามสมการ cell surface hydrophobicity (%) = $\{(OD_0-OD_t)/OD_0\} \times 100$ เมื่อ OD_0 และ OD_t คือความขุ่นของเซลล์แขวนลอยก่อนผสมทูลูอีนหรือไซลีนและความขุ่นของชั้นน้ำหลังผสมทูลูอีนหรือไซลีน

2.4 การต้านทานสารปฏิชีวนะ

ทดสอบการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะโดยวิธี disc diffusion (Bauer *et al*., 1966) โดยนำสำลี (cotton swab) จุ่มในแบคทีเรียความเข้มข้น 10^8 CFU/mL และเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารแข็ง Brain Heart Infusion (Difco, Detroit, MI, USA) เมื่อผิวหน้าอาหารแห้งนำแผ่นยาปฏิชีวนะจำนวน 13 ชนิด ได้แก่ ampicillin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), cephalothin (30 µg), erythromycin (15 µg), gentamycin (10 µg), kanamycin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), nitrofurantoin (300 µg), norfloxacin (10 µg), novobiocin (5 µg), tetracycline (30 µg), sulfamethoxazole/trimethoprim (23.75 µg/1.25 µg)

และ oxytetracycline (30 µg) วางบนผิวหน้าอาหารแข็ง บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส รายงานผลเป็น susceptible (S), intermediate (I) และ resistant (R) ตามมาตรฐานที่กำหนดไว้สำหรับสารปฏิชีวนะแต่ละชนิด

3. การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติก

นำแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกไปเทียบเคียงสายพันธุ์ โดยทำ polymerase chain reaction (PCR) มี universal primers เป็น 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') และวิเคราะห์ลำดับเบส 16S rDNA โดย blast ผลกับนิวคลีโอไทด์ใน NCBI ดำเนินการโดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

4. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำผลการทดลองมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียวด้วยวิธีทางสถิติ ด้วย ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารของไก่เบตง

การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากกระเพาะพัก ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ของไก่เบตง พบแบคทีเรียสร้างกรดซึ่งติดสีแกรมบวกและไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส จำนวน 145 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) ปริมาณ 1.00×10^4-$1.47x10^8$ CFU/g ใกล้เคียงกับปริมาณแบคทีเรียแลกติก (10^5-10^8 CFU/g) ที่พบในกระเพาะพัก ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และไส้ติ่งของไก่กระทงอายุ 40-50 วัน และไก่พื้นเมืองอายุ 3-4 เดือน ที่ขายในท้องตลาดทั่วไป (หทัยรัตน์, 2551)

ตารางที่ 1 จำนวนไอโซเลทและความเข้มข้นของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารไก่เบตง

ทางเดินอาหาร	จำนวนไอโซเลท	แบคทีเรียแลกติก (CFU/g)
กระเพาะพัก	64	4.50×10^4-1.47×10^8
ลำไส้เล็ก	39	1.00×10^4-4.90×10^7
ลำไส้ใหญ่	42	1.00×10^4-1.21×10^8

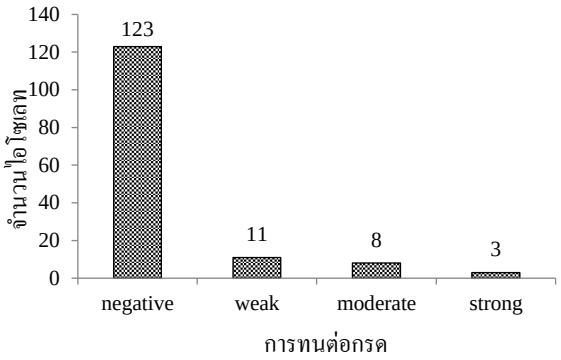
2. การทนต่อกรด

การทนต่อกรดเป็นคุณสมบัติสำคัญอันดับแรกของโปรไบโอติก เนื่องจากโปรไบโอติกจะถูกบริโภคผ่านทางหลอดอาหารไปยังกระเพาะอาหาร ซึ่งกระเพาะอาหารไก่ประกอบด้วย กระเพาะพัก กระเพาะจริงและกระเพาะบด กระเพาะแต่ละส่วนมีพีเอชเท่ากับ 4.0-6.3, 3.2-4.8 และ 2.5-4.7 ตามลำดับ (หทัยรัตน์, 2551) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้คุณสมบัตินี้คัดกรองแบคทีเรียแลกติกเป็นอันดับแรก จากการทดสอบการทนต่อกรดพีเอช 2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบแบคทีเรียแลกติกมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าร้อยละ 50 จำนวน 22 ไอโซเลท (ร้อยละ 15.17) และมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าร้อยละ 90 จำนวน 3 ไอโซเลท (ภาพที่ 1) คือ F/Si 06001, F/Cr 01010 และ A/Si 01002 ในขณะที่แบคทีเรียแลกติกโปรไบโอติก LT116 และ LT130 ที่คัดแยกจากทางเดินอาหารไก่กระทง มีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่าร้อยละ 60 และ 30 ตามลำดับ ในสภาวะพีเอช 2 นาน 90 นาที (Taheri *et al*., 2009a) และสอดคล้องกับการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักดองซึ่งพบว่าแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลท จากทั้งหมด 23 ไอโซเลท ทนต่อพีเอช 2 ได้ดี มีปริมาณเซลล์มากกว่า 10^8 CFU/mL (สายใจ และคณะ, 2558)

โดยในที่นี้แบคทีเรียที่ทนกรดได้ส่วนใหญ่คือแบคทีเรียจากกระเพาะพัก (11 ไอโซเลท) เป็นไปได้ว่าเป็นเพราะแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบได้ในกระเพาะพัก เนื่องจากค่าความเป็นกรดด่างภายนอกเซลล์ส่งผลต่อความเป็นกรดด่างของไซโตพลาซึมของเซลล์ ดังนั้นโดยทั่วไปแบคทีเรียแลกติกจะชะลอการเจริญเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีค่าเป็นกรดหรือด่างสูง (ฐิติรัตน์ และ นงนุช, 2555) แต่การที่แบคทีเรียแสดงความแตกต่างกันในการทนต่อกรดอาจเกิดความแตกต่างขององค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และกิจกรรมของเอนไซม์ H^+-ATPase ของแบคทีเรียนั้น (Musikasang *et al*., 2009) แบคทีเรียที่ทนต่อกรดได้ดีเกิดจาก H^+-ATPase ขับโปรตอนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดี ส่งผลต่อการรักษาค่าพีเอชของไซโตพลาซึมให้คงที่ (Matsumoto *et al*., 2004; Ventura *et al*., 2004) ดังที่เคยมีรายงานการทนกรดของ *L. acidophilus* และ *Enterococcus hirae* เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์นี้ (Kobayashi *et al*, 1986; Lorca and Valdez, 2001) แม้ว่าทางเดินอาหารของไก่จะสั้นกว่าสัตว์อื่นและอาหารจะอยู่ในทางเดินอาหารประมาณ 2.5 ชั่วโมงเท่านั้น อย่างไรก็ตามพบว่าพีเอชของน้ำย่อยในอาหารสามารถลดต่ำลงได้ถึง 0.5-2.0 ดังนั้นจึงมีอิทธิพลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์

3. การมีชีวิตรอดภายในสภาวะระบบกระเพาะและลำไส้จำลอง

โปรไบโอติกจะถูกบริโภคและผ่านสภาวะในกระเพาะอาหารที่มีพีเอชระหว่าง 2.5-4.8 และมีเปปซินแล้วจึงผ่านลำไส้เล็กซึ่งมีพีเอชระหว่าง 5.7-8.4 (รุจา, 2544) และมีเอนไซม์แพนครีเอตินและเกลือน้ำดีอยู่ด้วย ดังนั้นแบคทีเรียที่ได้รับผลกระทบจากสภาวะกรดสูงจะได้รับการเปลี่ยนแปลงสภาวะอย่างกระทันหันและเป็นสภาวะที่มีผลกระทบต่อการรอดชีวิต ดังนั้นการทดสอบเลียนแบบสภาวะทางเดินอาหารจริงจึงเป็นการทดสอบที่บอกถึงการรอดชีวิตของแบคทีเรียได้ใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด การทดลองพบว่าไอโซเลท A/Li 05011 มีอัตราการรอดชีวิตผ่านระบบทางเดินอาหารจำลองสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 88.59 และ



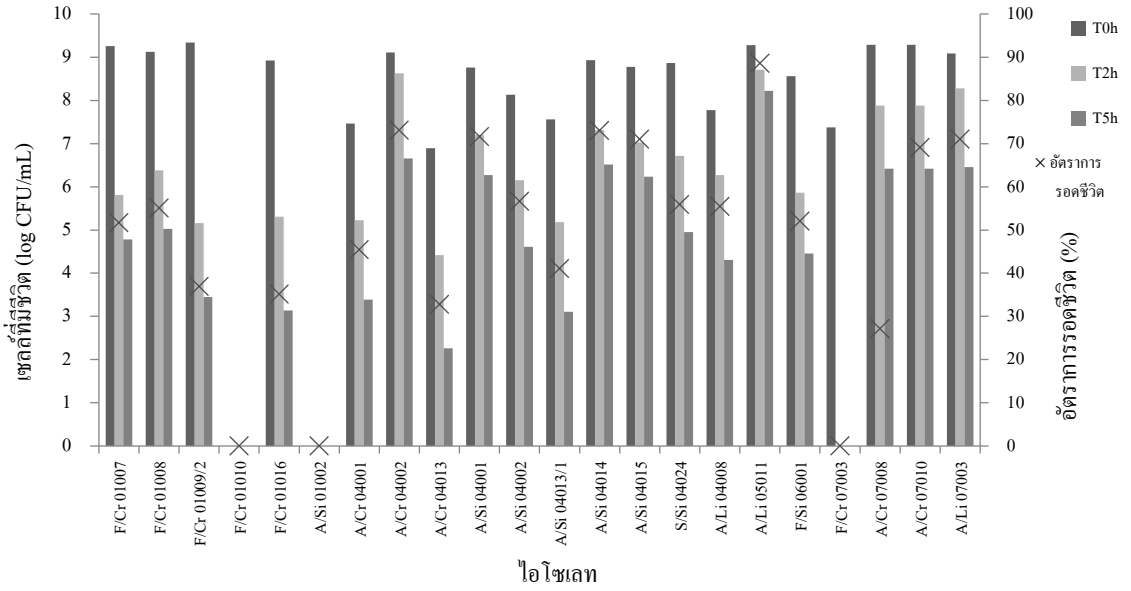
ภาพที่ 1 การทนต่อกรดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกจากกระเพาะพัก ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ของไก่เบตงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (อัตราการรอดชีวิต <50% = ไม่ทน, 50-75% = ต่ำ, 75-90% = ปานกลาง, >90% = มาก)

ไอโซเลทที่มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าร้อยละ 50 ได้แก่ F/Cr 01007, F/Cr 01008, A/Cr 04002, A/Si 04001, A/Si 04002, A/Si 04014, A/Si 04015, S/Si 04024, A/Li 04008, F/Si 06001, A/Cr 07010 และ A/Li 07003 (ภาพที่ 2) ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Zoumpopoulou *et al*. (2008) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกจากทางเดินอาหารไก่มีทั้งกลุ่มที่ไม่ทนและกลุ่มที่ทนต่อสภาวะระบบกระเพาะและลำไส้จำลอง แบคทีเรียบางกลุ่มสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยน้ำดี (bile salt hydrolase) (Knarreborg *et al*., 2003) ทำให้น้ำดีผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปทำลายเซลล์ได้ลดลง แบคทีเรียเหล่านี้จึงทนต่อน้ำดีได้ (Erkkilä and Petäjä, 2000) มีผลให้อัตราการรอดชีวิตหลังผ่านระบบทางเดินอาหารจำลองสูง แตกต่างจากแบคทีเรียที่ไวต่อเกลือน้ำดี ซึ่งเกลือน้ำดีจะทำลายไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์แยกตัวออก

ทำให้เกิดการฉีกขาดของเยื่อหุ้มเซลล์และเซลล์ตายในที่สุด (Musikasang *et al*., 2009)

4. ความไม่ชอบน้ำของเซลล์เซอร์เฟส

การวัดความไม่ชอบน้ำของเซลล์เซอร์เฟสเป็นวิธีการทางอ้อมในการวัดความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรียกับสารประกอบไฮโดรคาร์บอนและยึดเหนี่ยวกับ epithelium ของทางเดินอาหารได้อย่างแข็งแรง เป็นวิธีที่ได้รับการยืนยันว่ามีประสิทธิภาพและสามารถใช้ทดแทนการยึดเกาะของแบคทีเรียกับเยื่อเมือกได้เป็นอย่างดี (Taheri *et al*., 2009a) แบคทีเรียที่เซลล์เซอร์เฟสมีความไม่ชอบน้ำสูงหมายถึงมีความสามารถในการยึดเกาะสูง ผลการทดลองแสดงทิศทางของความไม่ชอบน้ำซึ่งทดสอบโดยไซลีนและทูลูอีนเป็นไปในทิศทางเดียวกันและสอดคล้องกับการศึกษาที่คณะผู้วิจัยได้ทำวิจัยไว้ก่อนหน้านี้ในกลุ่มของแบคทีเรียแลกติก (Kaew-on and Wanchaitanawong, 2015) แบคทีเรียที่เซลล์เซอร์เฟสมีความไม่ชอบน้ำสูงได้แก่ F/Cr 01007, A/Cr 04001, A/Cr 04013, A/Si 04001, A/Si 04002, A/Si 04013/1, A/Si 04014, A/Si 04015, S/Si 04024, A/Li 05011 และ F/Si 06001 ซึ่งแสดงความไม่ชอบน้ำ 90.07±1.26 ถึง 93.59±5.92 ในไซลีน และ 82.89±3.37 ถึง 95.24±4.89 ในทูลูอีน (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 2 อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกจากไก่เบตงในสภาวะระบบกระเพาะอาหารและลำไส้จำลองที่มีมีเปปซิน 3 มก./มล. พีเอช 2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ต่อเนื่องด้วยแพนครีเอติน 1 มก./มล. และเกลือน้ำดีร้อยละ 1 ที่พีเอช 8 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

5. การต้านทานสารปฏิชีวนะ

ความสามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะถือเป็นคุณสมบัติที่น่าสนใจอย่างหนึ่งของโปรไบโอติก เนื่องจากในการเลี้ยงสัตว์แม้ผู้ผลิตจะหลีกเลี่ยงการใช้สารปฏิชีวนะโดยหันมาใช้โปรไบโอติก หากแต่เมื่อเกิดการระบาดของโรคก็อาจมีความจำเป็นต้องใช้สารปฏิชีวนะร่วมด้วย การใช้โปรไบโอติกที่ทนสารปฏิชีวนะจึงน่าจะมีผลดีต่อสัตว์ ในงานวิจัยนี้ทดสอบความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะทดสอบของแบคทีเรียแลกติกต่อสารปฏิชีวนะ 13 ชนิด พบว่าแบคทีเรียแลกติกทุกไอโซเลทต้านทานสารปฏิชีวนะ nalidixic acid และ sulfamethoxazole/trimethoprim

แบคทีเรียที่ต้านทานสารปฏิชีวนะทุกชนิดที่นำมาทดสอบคือ A/Cr 07008 ตามมาด้วย A/Si 04014, A/Cr 07003 และ A/Li 07003 ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทต้านทานสารปฏิชีวนะที่นำมาทดสอบจำนวน 11 ชนิด ส่วนแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารปฏิชีวนะมากชนิดที่สุดได้แก่ F/Cr 01010 ซึ่งไวต่อสารปฏิชีวนะจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ tetracyclin, oxytetracyclin, cephalothin, chloramphenicol, nitrofurantoin และ ampicillins (ตารางที่ 3) การต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียมีพื้นฐานมาจาก 2 ปัจจัย คือมียีนที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะและการปรับตัวในสภาวะที่มีสารปฏิชีวนะ ยีนต้านทานสารปฏิชีวนะมีผลดีต่อแบคทีเรียคือทำให้แบคทีเรียชนิดนั้นเจริญในสภาวะที่มีสารปฏิชีวนะนั้นๆ ได้ อย่างไรก็ตามยีนต้านทานสารปฏิชีวนะประเภทที่สามารถถ่ายทอดได้จะทำให้เกิดการถ่ายทอดยีนไปยังแบคทีเรียหรือสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น ถ่ายทอดสู่แบคทีเรียก่อโรค ทำให้เกิดการดื้อยาของแบคทีเรีย ซึ่งจะสร้างผลเสียต่อผู้ป่วยที่ได้รับเชื้อโรคที่ต้านทานสารสารปฏิชีวนะ เนื่องจากก่อให้เกิดปัญหาในการรักษา อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการถ่ายทอดยีนที่ต้านทานปฏิชีวนะจากแบคทีเรียแลกติกไปสู่จุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหารมนุษย์และแบคทีเรียก่อโรค (Mathur and Singh, 2005) การต้านทานสารปฏิชีวนะของ Lactobacilli ที่เกิดจากยีนที่มีอยู่เองและไม่ถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียอื่นได้แก่ ยีนต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ tetracycline, neomycin, kanamycin, streptomycin, gentamicin และ vancomycin (Saarela *et al*., 2000; Danielsen and Wind, 2003; Zhao and Zhang, 2005; Klare *et al*., 2007) พิจารณาในประเด็นของการปรับตัวในสภาวะที่มีสารปฏิชีวนะ เป็นไปได้ว่าในการเลี้ยงไก่เบตงนั้นเกษตรกรมีการใช้สารปฏิชีวนะเป็นเหตุให้พบการต้านทานสารปฏิชีวนะในแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ ซึ่งสารปฏิชีวนะนั้นอาจส่งผลกระทบทางลบต่อผู้บริโภค ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันจึงควรจะใช้วิธีการอื่น เช่น การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในการควบคุมโรคในไก่ เป็นต้น

ตารางที่ 2 ความไม่ชอบน้ำของเซลล์เซอร์เฟสของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารไก่เบตง

ไอโซเลท	ความไม่ชอบน้ำของเซลล์เซอร์เฟส (%)		ไอโซเลท	ความไม่ชอบน้ำของเซลล์เซอร์เฟส (%)	
	ไซลีน	ทูลูอีน		ไซลีน	ทูลูอีน
F/Cr 01007	90.28±0.59^{abc}	82.89±3.37^{bcd}	A/Si 04013/1	90.50±0.64^{abc}	87.30±2.67^{abc}
F/Cr 01008	58.52±2.63^{f}	47.83±5.70^{g}	A/Si 04014	90.99±5.49^{ab}	88.49±5.68^{ab}
F/Cr 01009/2	35.32±4.45^{g}	45.21±4.90^{g}	A/Si 04015	93.59±1.39^{a}	89.01±0.32^{ab}
F/Cr 01010	26.39±2.21^{h}	27.43±0.00^{i}	S/Si 04024	90.40±0.78^{abc}	95.24±4.89^{a}
F/Cr 01016	31.37±4.80^{gh}	56.17±1.14^{f}	A/Li 04008	86.39±0.94^{abc}	82.90±4.10^{bcd}
A/Si 01002	66.04±4.82^{e}	69.07±6.25^{e}	A/Li 05011	91.64±3.51^{a}	92.60±0.79^{a}
A/Cr 04001	92.36±4.05^{a}	92.38±1.96^{a}	F/Si 06001	90.89±1.52^{ab}	92.79±1.74^{a}
A/Cr 04002	83.97±7.20^{bcd}	88.66±3.80^{ab}	F/Cr 07003	29.88±8.68^{gh}	37.46±0.24^{h}
A/Cr 04013	90.07±1.26^{abc}	89.55±1.23^{ab}	A/Cr 07008	77.98±1.75^{d}	77.42±1.96^{d}
A/Si 04001	93.59±5.92^{a}	94.32±3.66^{a}	A/Cr 07010	83.20±1.87^{cd}	79.71±2.79^{cd}
A/Si 04002	91.20±1.71^{ab}	89.56±2.57^{ab}	A/Li 07003	36.09±2.75^{g}	51.11±5.35^{fg}

แสดงค่าเฉลี่ย ± SD ของผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ตัวอักษรยกกำลังที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เปรียบเทียบในคอลัมน์เดียวกัน

ตารางที่ 3 การต้านทานสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารไก่เบตง

ไอโซเลท	ความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ												
	K 30*	TE 30	T 30	NB 5	CF 30	C 30	F/M 300	GM 10	NOR 10	AM 10	E 15	NA 30	SXT
F/Cr 01007	R	R	R	R	R	I	S	S	I	I	R	R	R
F/Cr 01008	I	I	I	R	I	S	R	S	R	S	R	R	R
F/Cr 01009/2	I	I	I	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R
F/Cr 01010	R	S	S	I	S	S	S	R	R	S	I	R	R
F/Cr 01016	I	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R
A/Si 01002	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R
A/Cr 04001	I	R	R	R	R	I	S	S	R	I	R	R	R
A/Cr 04002	R	R	R	I	R	S	S	S	R	R	R	R	R
A/Cr 04013	S	R	R	I	R	S	S	S	R	R	R	R	R
A/Si 04001	S	R	R	I	R	S	S	S	R	R	R	R	R
A/Si 04002	S	R	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	R
A/Si 04013/1	S	R	R	I	I	R	S	S	R	I	R	R	R
A/Si 04014	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R
A/Si 04015	R	I	R	R	R	I	S	R	I	R	R	R	R
S/Si 04024	S	R	I	I	I	I	S	S	I	R	R	R	R
A/Li 04008	R	R	R	I	R	S	S	S	R	R	R	R	R
A/Li 05011	S	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R
F/Si 06001	S	R	R	I	I	S	S	S	R	I	R	R	R
F/Cr 07003	R	R	R	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R
A/Cr 07008	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A/Cr 07010	R	R	R	R	I	S	I	S	R	S	R	R	R
A/Li 07003	R	R	R	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R

* K 30, kanamycin; TE 30, tetracycline; T 30, oxytetracycline; NB 5, novobiocin; CF 30, cephalothin; 30, chloramphenicol; F/M 300, nitrofurantoin; GM 10, gentamycin; NOR 10, norfloxacin; AM 10, ampicillin; E 15, erythromycin; NA 30, nalidixic acid and SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim

R, resistant; I, intermediate; S, susceptible

6. การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติก

แบคทีเรียแลกติกที่มีศักยภาพเพียงพอที่จะใช้เป็นโปรไบโอติกในไก่ จำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ F/Cr 01007, A/Si 04002, S/Si 04024, A/Li 04008, A/Li 05011, F/Si 06001 และ A/Cr 07010 ถูกคัดเลือกนำไปทำการเทียบเคียงสายพันธุ์ โดยนำสารพันธุกรรมมาทำ PCR มี universal primers เป็น 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') และวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA โดย blast ผลกับนิวคลีโอไทด์ใน NCBI พบว่าลำดับเบสร้อยละ 99 ของแบคทีเรียแลกติกเหมือนกับ *L. reuteri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลกติกที่พบมากในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ สัตว์ปีก สุกร และสัตว์ชนิดอื่นๆ แม้ว่าสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่พบแต่ละแห่งจะแตกต่างกัน แต่จะมีลักษณะทางสรีรวิทยาและพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน จัดอยู่ในกลุ่ม obligate heterofermentative enterolactobacilli มีความสามารถในการผลิตสารเมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และปล่อยออกนอกเซลล์ได้ พบการผลิตรูเทอรินจากกระบวนการหมักกลีเซอรอล โดยรูเทอรินที่ได้มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์หลายกลุ่ม

ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา มีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียจากลำไส้ไก่แล้วพบว่าเป็น *L. reuteri* เช่นเดียวกัน ได้แก่ งานวิจัยของ Nitisinprasert *et al*. (2000) ซึ่งคัดแยกแบคทีเรียแลกติกชนิด *L. reuteri* KUB-AC5, KUB-AC16 และ KUB-AC21 ที่มีคุณสมบัติสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้

สรุป

แบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากทางเดินอาหารทั้งในกระเพาะพัก ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ไก่เบตง จำนวน 145 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลทที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกด้วยคุณสมบัติทนต่อกรด มีอัตราการรอดชีวิตสูงในทางเดินอาหารจำลอง เซลล์เซอร์เฟสมีความไม่ชอบน้ำสูง และต้านทานสารปฏิชีวนะทดสอบคือ F/Cr 01007, A/Si 04002, S/Si 04024, A/Li 04008, A/Li 05011, F/Si 06001 และ A/Cr 07010 ซึ่งผลการเทียบเคียงสายพันธุ์โดย 16S rDNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *L. reuteri* ร้อยละ 99

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลาที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

ฐิติรัตน์ รัตนวิวัลย์ และ นงนุช เลาหะวิสุทธิ์. 2555. การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกจากระบบทางเดินอาหารปลาทะเล, น. 220-229. *ใน* **การประชุมวิชาการงานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 10 (เกษตรภาคเหนือตอนล่าง) ความมั่นคงทางอาหารภายใต้ภาวะภัยพิบัติทางธรรมชาติ.** มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.

ปิ่น จันจุฬา, วรวิทย์ วณิชชาภิชาติ, ธำรง ทองจำรูญ และ สมศักดิ์ เหล่าเจริญสุข. 2543. การเลี้ยงไก่เบตงในหมู่บ้าน 3 จังหวัดชายแดนภาค ใต้ของประเทศไทย: การศึกษาลักษณะปรากฏการเจริญเติบโต เปอร์เซ็นต์ซาก และลักษณะการผลิตไข่ของไก่เบตง. **วารสารเกษตร** 20(3): 278-288.

รุจา มาลัยพวง. 2544. การผลิตโปรไบโอติกในวัตถุดิบอาหารไก่โดยเลือกใช้แบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกจากอาหารหมักดองของไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สายใจ แก้วอ่อน, กิบรียา หะยะเจ๊ะแว และ ณูรีซัน หะยีมิง. 2558. การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและความทนต่อกรด-ด่างจากอาหารหมัก, น. 100-107. *ใน* **งานประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 4 การวิจัยและนวัตกรรมเพื่อพัฒนาท้องถิ่นสู่ประชาคมอาเซียน.** มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์, นราธิวาส.

สุมิตรา แสงวนิชย์. 2550. ไก่เบตง: หนึ่งศักยภาพในการพัฒนาชีวิตประชาชน 3 จังหวัด ชายแดนใต้. **วารสารอัล-นูร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยอิสลามยะลา** 2(2): 55-63.

หทัยรัตน์ มุสิกสังข์. 2551. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่เป็นโปรไบโอติกในไก่และการเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อโดยการห่อหุ้ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Balcázar, J.L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz Zarzuela, I., Muzquiz, J.L. and Girones, O. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. **Aquaculture** 278: 188-191.

Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J. and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology** 45: 493-496.

Danielsen, M. and Wind, A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology** 82(1): 1-11.

Erkkilä, S. and Petäjä, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science** 55: 297-300.

Heravi, R.M., Kermanshahi, H., Sankian, M., Nassiri, M., Heravi-Moussavi, A., Rouzbeh, L. and Varasteh, R. 2011. Screening of lactobacilli bacteria isolated from gastrointestinal tract of broiler chickens for their use as probiotic. **African journal of microbiology research** 5(14): 1858-1868.

Kaew-on, S. and Wanchaitanawong, P. 2015. Antagonistic activity against fish pathogens and *in vitro* probiotics properties of lactic acid bacteria. pp. B59-B68. *In* **Proceeding of International Conference On Research, Implementation and Education of Mathematics and Sciences 2015.** Yogyakarta State University, Yogyakarta.

Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Müller-Bertling, S., Witte, W. and Goossens, H. 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 59(5): 900-912.

Klayraung, S., Okonogi, S., Sirithunyalug, J. and Viermstein, H. 2008. Comparative probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from Thai traditional fermented foods: Miang and Nham. **Research Journal of Biological Sciences** 3(9): 1119-1124.

Knarreborg, A., Jensen, S.K. and Engberg, M. 2003. Pancreatic lipase activity as influenced by unconjugated bile acids and pH, measured *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Nutritional Biochemistry** 14: 259-265.

Kobayashi, H., Suzuki, T. and Unemoto, Y. 1986. Streptococcal cytoplasmic pH is regulated by changes in amount and activity of a proton-translocating ATPase. **Journal of Biological Chemistry** 261: 627-630.

Lertworapreecha, N., Poonsuk, K. and Chalermchiakit, T. 2011. Selection of potential *Enterococcus faecium* isolated from Thai native chicken for probiotic use according to the *in vitro* properties. **Songklanakarin Journal Science and Technology** 33(1): 9-14.

Lorca, G.L. and Valdez, G.F. 2001. A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus* CRL639. **Current Microbiology** 42: 21-25.

Mathur, S. and Singh, R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review **International Journal of Food Microbiology** 105: 281-295.

Matsumoto, M., Ohishi, H. and Benno, Y. 2004. H^+-ATPase activity in Bifidobacterium with special reference to acid tolerance. **International Journal of Food Microbiology** 93(1): 109-113.

Musikasang, H., Tani, A., H-kittikun, A. and Maneerat, S. 2009. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 25(8): 1337-1345.

Nitisinprasert, S., Nilphai, V., Bunyun, P., Sukyai, P., Doi, K. and Sonomoto, K. 2000. Screening and identification of effective thermotolerant lactic acid bacteria producing antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. resistant to antibiotics. **Kasetsart Journal (Natural Science)** 34: 387-400.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., and Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology** 84: 197-215.

Sahu, M., Swarnakumar, N., Sivakumar, K., Thangaradjou, T. and Kannan, L. 2008. Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. **Indian Journal of Microbiology** 48(3): 299-308.

Shah, N.P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Sciences** 83: 894-907.

Sieladie, D.V., Zambou, N.F., Kaktcham, P.M., Cresci, A. and Fonteh, F. 2011. Probiotic properties of lactobacilli strains isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon. **Innovative Romanian Food Biotechnology** 9: 12-28.

Taheri, H.R., Moravej, H., Tabandeh, F., Zaghari, M., and Shivazad, M. 2009a. Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic. **Poultry Science** 88(8): 1586-1593.

Taheri, H., Tabandeh, F., Moravej, H., Zaghari, M., Shivazad, M. and Shariati, P. 2009b. Potential probiotic of *Lactobacillus johnsonii* LT171 for chicken nutrition. **African Journal of Biotechnology** 8(21): 5833-5837.

Ventura, M., Canchaya, C., van Sinderen, D., Fitzgerald, G.F. and Zink, R. 2004. *Bifidobacterium lactis* DSM 10140: identification of the atp (atpBEFHAGDC) operon and analysis of its genetic structure, characteristics, and phylogeny. **Applied and Environmental Microbiology** 70(5): 3110-3121.

Zhao, G. and Zhang, G. 2005. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. **Journal of Applied Microbiology** 99(2): 333-338.

Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Christodoulou, K., Grangette, C., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2008. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential *in vitro* and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and Salmonella infection in murine models. **International**

Journal of Food Microbiology 121(1):
18-26.