

# การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตแบคทีเรียโอซินที่สามารถยับยั้ง

## การเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคเต้านมอักเสบในโคนม

### Screening of Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocin Capable to Inhibit the Growth of Bovine Mastitis Pathogens

ณัฏฐิกา วัชรเทวินทร์กุล\* และ จีรนนท์ สวนชูโต

Yanika Wacharatewinkul\* and Jeeranan Suanchuto

Received: 9 December 2019, Revised: 10 March 2020, Accepted: 12 March 2020

#### บทคัดย่อ

การรักษาโรคเต้านมอักเสบในโคนมโดยการใช้ยาปฏิชีวนะอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำนมดิบ เนื่องจากการเกิดการตกค้างในน้ำนม แบคทีเรียโอซินเป็นเปปไทด์หรือโปรตีนที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียสามารถใช้เป็นสารลดปริมาณอาหารที่มีความปลอดภัย และใช้ในการรักษาโรคเต้านมอักเสบได้ งานวิจัยนี้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินจากหอยคอง แหนม มุลสุกร และมุลโค ด้วยวิธี Agar spot test และทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบ ได้แก่ *Streptococcus agalactiae* และ *Streptococcus uberis* จากการคัดแยกพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 57 ไอโซเลท เป็นชนิดแกรมบวก รูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ มีทั้งชนิดที่สร้างและไม่สร้างแก๊สจากการหมักน้ำตาลกลูโคส และให้ผลลบในการทดสอบกะตะเลส โดยมีแบคทีเรีย 36 และ 32 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* และ *S. uberis* ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบ Cell-free neutralized supernatant (CFNS) กับเอนไซม์ย่อยโปรตีน (protease) พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อของแบคทีเรียไอโซเลท LAB 21, LAB 31 และ LAB 34 มีค่าลดลงหรือหมดไป ซึ่งแสดงว่าสารออกฤทธิ์ดังกล่าวเป็นสารเปปไทด์ จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอซินด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท LAB 21, LAB 31 และ LAB 34 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* โดยทำให้เกิดวงใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 14.50, 12.15 และ 14.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. uberis* โดยทำให้เกิดวงใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยต่ำกว่าคือ 10.75, 10.50 และ 11.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งขนาดของวงใสที่เกิดการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ของแบคทีเรียไอโซเลท LAB 21 และ LAB 34 ไม่แตกต่างกันทางสถิติจากการใช้ยาปฏิชีวนะอะม็อกซิซิลลินในช่วงความเชื่อมั่น 95% ( $p \leq 0.05$ )

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม อำเภอเมืองนครปฐม จังหวัดนครปฐม 73000

Program of Microbiology, Faculty of Science and Technology, Nakhon Pathom Rajabhat University, Muang, Nakhon Pathom 73000, Thailand.

\* ผู้รับผิดชอบประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): yanika@webmail.npru.ac.th

**คำสำคัญ:** แบคทีเรียกรดแลคติก, แบคทีเรียโอซิน, โรคเต้านมอักเสบในโคนม, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*

## ABSTRACT

Bovine mastitis treatment with antibiotics may cause an impact on the quality of raw milk due to the occurrence of milk residues. Bacteriocin is a peptide or protein synthesized by bacteria. It can be used as a safe food preservative and used for mastitis treatment. This research aimed to isolate bacteriocin-producing lactic acid bacteria from pickled cockle, sour pork (Nham), pig and cow dungs using agar spot test. Antibacterial capacity against mastitis pathogens: *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis* were determined. It was found that 57 isolated lactic acid bacteria were gram positive, rod shaped, non-spore forming, non-motile, gas-producing or non gas-producing, and catalase negative. There were 36 and 32 isolated bacteria that could inhibit *S. agalactiae* and *S. uberis*, respectively. The inhibitory activities of bacterial isolates LAB 21, LAB 31, and LAB 34 were decreased or disappeared when tested their Cell-free neutralized supernatant (CFNS) with protease. The results revealed that CFNS were peptide. The efficacy of bacteriocins tested by agar well diffusion showed that bacterial isolates LAB 21, LAB 31 and LAB 34 had clear zones of 14.50, 12.50 and 14.00 mm against *S. agalactiae* respectively, whereas they had lower clear zones of 10.75, 10.50 and 11.50 mm against *S. uberis*, respectively. There were no significant differences between clear zones of LAB 21, LAB 34 and amoxicillin on *S. agalactiae* at 95% confidence interval ( $p \leq 0.05$ ).

**Key words:** lactic acid bacteria, bacteriocin, bovine mastitis, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*

## บทนำ

โรคเต้านมอักเสบ (mastitis) เป็นปัญหาที่สำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนมทั้งในระดับประเทศและระดับโลก เนื่องจากทำให้คุณภาพและปริมาณน้ำนมจากแม่โคลดลง รวมถึงทำให้ต้นทุนในการเลี้ยงโคสูงขึ้นส่งผลกระทบต่อรายได้ของเกษตรกรและการสูญเสียทางเศรษฐกิจ (Kim *et al.*, 2004; Kalińska *et al.*, 2017; Panneum *et al.*, 2007; Kajaysri *et al.*, 2014) โรคเต้านมอักเสบแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ โรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการ (Clinical mastitis) และโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (sub-clinical mastitis) (Lakshmi, 2016)

ซึ่งสาเหตุสำคัญของโรคเต้านมอักเสบในโคนมคือการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ก่อโรค 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) จุลินทรีย์ที่ติดต่อจากเต้านมสู่เต้านม (Contagious microorganism) เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus agalactiae* 2) จุลินทรีย์ที่อยู่ตามสิ่งแวดล้อม (Environmental microorganism) ได้แก่ แบคทีเรีย *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bavis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumonia* 3) จุลินทรีย์ฉวยโอกาส ได้แก่ *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus chromogenes* และ

*Staphylococcus simulans* 4) จุลินทรีย์ที่พบได้ไม่น้อย ได้แก่ *Corynebacterium bovis* และ *Mycoplasma bovis* ซึ่งคิดเชื้อจากเต้านมผู้เต้านม *Pseudomonas aeruginosa*, *Nocardia asteroides*, *Bacillus cereus* รวมถึงจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในคน ได้แก่ *Streptococcus pyogenes* และ *Streptococcus pneumonia* (Pieterse and Todorov, 2010; Kajaysri *et al.*, 2014) มีรายงานการตรวจพบเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบในตัวอ่อนนํ้านมที่ได้จากแม่โคป่วยในเขตจังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี ซึ่งพบว่าเชื้อก่อโรคที่พบมาก 3 ลำดับแรก คือ เชื้อก่อโรค จากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ โคลิฟอร์ม แบคทีเรีย *Staphylococci* spp. และ *Streptococci* spp. ซึ่งมีความไวต่อยาปฏิชีวนะอะม็อกซิซิลลิน-คลาวูลานิก (amoxicillin-clavulanic acid) และ เอนโรฟลอคซาซิน (enrofloxacin) (Panneum *et al.*, 2007) โดยแบคทีเรียก่อโรคจะทำลายเนื้อเยื่อภายในเต้านมทำให้เกิดการติดเชื้อ และเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเต้านม ทำให้นํ้านมที่ผลิตได้มีคุณภาพต่ำ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของนํ้านมดิบ รวมถึงมีการปนเปื้อนของเม็ดเลือดขาวมากกว่าปกติ (Butprom, 2013) นํ้านมที่ได้จากแม่โคที่มีสุขภาพดีจะมีปริมาณโซมาติกเซลล์ (somatic cells count, SCC) น้อยกว่า 200,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Kalińska *et al.*, 2017) ซึ่งแม่โคที่เป็นโรค เต้านมอักเสบจะมีปริมาณโซมาติกเซลล์ในนํ้านมมากกว่าที่พบจากแม่โคที่ไม่เป็นโรคอย่างมีนัยสำคัญ และมีปริมาณแลคโตสลดลงในขณะที่มีค่า pH สูงขึ้น (Luangwilai, 2017) การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในนํ้านมจากแม่โคที่ติดเชื้อเต้านมอักเสบส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภคและก่อให้เกิดปัญหาการติดเชื้อจากสัตว์สู่คน (zoonotic) อีกด้วย (León-Galván *et al.*, 2015) ปัจจุบันการรักษาโรคเต้านมอักเสบทำได้โดยใช้สารปฏิชีวนะ (antibiotics) ซึ่งสามารถตกค้างได้ในนํ้านม และ

ก่อให้เกิดปัญหาการไม่ยอมรับของตลาด (National Institute of Animal Health, 2006) โดยยาปฏิชีวนะส่วนใหญ่เป็นยาที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อในวงกว้าง (broad spectrum antibiotics) ครอบคลุมทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น เพนิซิลลิน (penicillin) แอมพิซิลลิน (ampicillin) คลอกซาซิลลิน (cloxacillin) อะม็อกซิซิลลิน (amoxicillin) นาฟซิลลิน (nafcillin) เมธิซิลลิน (methicillin) เซฟาเลกซิน (cephalexin) เซฟูโรซิม (cefuroxime) เซฟาพิริน (cephapirin) และกรดคลาวูลานิก (clavulanic acid) เป็นต้น (Pieterse and Todorov, 2010) การให้ยาปฏิชีวนะ เช่น ยาทราย (dry) โดยการสอดเข้าเต้านมแม่โคในระยะหยุดพักรีดนมสามารถช่วยลดความเสี่ยงในการปนเปื้อนของยาปฏิชีวนะในนํ้านม (Chanlun, 2011)

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (cocci) หรือแท่ง (rods) ไม่สร้างสปอร์ และเอนไซม์อะตาเลส (catalase) ทนทานต่อสภาวะที่มีความเป็นกรด จึงนิยมใช้ในการผลิตอาหารหมัก แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในอาหารหมักสามารถสร้างสารเมแทบอไลต์ (metabolites) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น กรดแลคติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีริโอซินซึ่งเป็นสารประกอบ เพปไทด์ (peptide) (Mokoena, 2017) แบคทีริโอซินสามารถนำมาใช้ในการถนอมอาหารซึ่งได้รับการรับรองว่ามีความปลอดภัย และยังนำมาใช้ในการรักษาโรคเต้านมอักเสบที่เกิดจากเชื้อ *S. aureus*, *S. agalactiae* และ *S. dysgalactiae* อีกด้วย (Pieterse *et al.*, 2010) ปัจจุบันมีการผลิตแบคทีริโอซินทางการค้า เช่น นิสิน (nisin) และแลคติซิน 3147 (lacticin 3147) จากแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* โดยมีการใช้แลคติซิน 3147 เป็นส่วนประกอบของครีมสอดรูหัวนม (teat seal) เพื่อรักษาโรคเต้านมอักเสบในแม่โคแห้งนม

(dry cow) (Pieterse and Todorov, 2010; Carson *et al.*, 2017) แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* spp. เช่น *L. acidophilus* และ *L. bulgaricus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติก รูปร่างแท่ง มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส์ (probiotics) สามารถสร้างแบคทีเรียโอซิน (Kim *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 2010) *L. sakei* และ *L. curvatus* สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินซาคาซิน (sakacin) และเคอร์วาซิน (curvacin) ตามลำดับ (Costa *et al.*, 2019) งานวิจัยนี้จึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคได้นามอีกเสบในโคนม จากอาหารหมักดองและมูลสัตว์

## วิธีดำเนินการวิจัย

### 1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดองและมูลสัตว์

คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกตามวิธีของ Rueangyotchanthana (2013) จากตัวอย่างอาหารหมักดองและมูลสัตว์ ได้แก่ หอยดอง แหนม มูลสุกร และมูลโค โดยเจือจางตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ เจือจางให้ได้ความเข้มข้น  $10^{-4}$ - $10^{-6}$  จากนั้นดูดสารละลายเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหาร De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (HiMedia) ที่เติม Bromocresol purple เข้มข้น 0.004 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในโถปราศจากออกซิเจน จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีบริเวณสีเหลืองโดยรอบ มาฉีดไขว้บนอาหาร MRS agar ที่มี Bromocresol purple เข้มข้น 0.004 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มในโถปราศจากออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีบริเวณสีเหลืองโดยรอบ และทำซ้ำขั้นตอนเดิมเพื่อให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ เก็บเชื้อ

บริสุทธิ์ในสารละลายกลีเซอรอลเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 2. การศึกษาพื้นฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ไปย้อมสีแบบแกรมเพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรม โดยคัดเลือกเชื้อที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์และเอนไซม์คะตะเลส (catalase test) โดยแตะเชื้อทดสอบลงบนกระจกสไลด์ที่มีหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส จะให้ผลการทดสอบเป็นลบ โดยไม่ทำให้เกิดฟองแก๊สบนกระจกสไลด์ จากนั้นนำไปทดสอบการเคลื่อนที่ (motility test) โดยแทงเข็มเย็บเชื้อที่มีแบคทีเรียลงในอาหาร Motility test medium ในแนวตั้ง (HiMedia) และทดสอบการหมักน้ำตาลกลูโคสในอาหารเหลว (HiMedia) ที่เติม Bromocresol purple เพื่อบ่งชี้ความเป็นกรดต่าง

### 3. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* และ *S. uberis* ด้วยวิธี Agar spot test

เตรียมเชื้อทดสอบ *S. agalactiae* และ *S. uberis* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลสัตว์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หนองโพ โดยนำเชื้อมาฉีดลงบนอาหาร Blood agar (HiMedia) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาทดสอบด้วยวิธี Agar spot test (ดัดแปลงจาก Rueangyotchanthana, 2013) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB, HiMedia) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เจือจางให้ได้ปริมาณเชื้อ  $10^6$  CFU/ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้ลงในอาหารเหลว MRS (HiMedia) โดยบ่มในโถปราศจากออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วหยดซัสเพนชัน

ของแบคทีเรียกรดแลกติก ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง MRS จำนวน 8 จุด นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในโถปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนพบการเจริญของแบคทีเรีย กรดแลกติกทั้ง 8 จุด จากนั้นนำเชื้อทดสอบปริมาตร 1 มิลลิตร ผสมลงในอาหารแข็ง Tryptic Soy Agar (TSA, HiMedia) (ที่เติมผงวุ้น 0.5 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 9 มิลลิตร ซึ่งผสมเลือดวัว 5 เปอร์เซ็นต์ แล้วเททับลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีแบคทีเรียกรด แลกติก รอให้แห้ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตโซนใสรอบรอย หยดทั้ง 8 จุด ของแบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งบ่งชี้ ความความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญ ของจุลินทรีย์ที่ทดสอบ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ของวงใส โดยคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่ทำให้ เกิดวงใสที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยมากกว่า 15 มิลลิเมตร มาทดสอบแบคทีเรียโอซิน

#### 4. การทดสอบแบคทีเรียโอซิน

การทดสอบแบคทีเรียโอซิน (ดัดแปลงจาก วิธีของ Siripoke *et al.*, 2007) เพื่อยืนยันว่าเป็นสาร ประเภทโปรตีนหรือไม่ ทำโดยเลี้ยงแบคทีเรียกรดแล คติกในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยก เซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำส่วนใส (supernatant) มาปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วย สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) หรือโซเดียมไฮ ดรอกไซด์ (NaOH)เข้มข้น 1 M จะได้ส่วนใสที่มี สภาพ pH เป็นกลาง (cell-free neutralized supernatant: CFNS) กรอง CFNS ที่ได้ผ่านกระดาษ กรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วเติมเอนไซม์ย่อย โปรตีน (Protease, Sigma Aldrich) (specific activity  $\geq 500$  U/g) ปริมาตร 15 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อน

นำไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย โดย เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเติมน้ำกลั่นปริมาตร 15 ไมโครลิตร แทนเอนไซม์

#### 5. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอซินใน การยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae* และ *S. uberis* ด้วยวิธี Agar well diffusion

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสาร แบคทีเรียโอซินในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เตรียม CFNS ตามวิธีการข้างต้น จากนั้นหยด CFNS ปริมาตร 90 ไมโครลิตร ลงในหลุมอาหาร TSA ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ซึ่งผ่าน การกลีด้วยเชื้อทดสอบ *S. agalactiae* หรือ *S. uberis* บนผิวหน้าอาหาร จากนั้นนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบประสิทธิภาพของ CFNS ในการยับยั้ง การเจริญของเชื้อทดสอบ โดยวัดขนาดโซนใสที่ เกิดขึ้นบนผิวหน้าอาหาร

### ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

#### 1. ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหาร หมักคองและมูลสัตว์

งานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแล คติกจากอาหารหมักคองและมูลสัตว์ได้ทั้งหมด 57 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) โดยคัดแยกได้จากหอยคอง 15 ไอโซเลท แหนม 19 ไอโซเลท มูลสุกร 11 ไอโซเลท และมูลโค 12 ไอโซเลท ซึ่งไอโซเลททั้งหมดสามารถ เจริญบนอาหารแข็ง MRS ที่เติม Bromocresol purple ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เนื่องจาก กรดแลกติกที่แบคทีเรียสร้างขึ้น (Sobrun *et al.*, 2012) จากการคัดแยกแบคทีเรียพบว่า แบคทีเรียไอ โซเลทที่คัดแยกได้จากแหนมมากที่สุด รองลงมาคือ หอยคอง มูลโค และมูลสุกร ตามลำดับ ทั้งนี้อาจ เนื่องมาจากตัวอย่างอาหารหมักมีค่า pH ต่ำ ส่งผลให้ กลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้มีความ

หลากหลายมากกว่าการคัดแยกจากตัวอย่างแหล่งอื่นๆ Tangwacharin *et al.* (2017) รายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารที่มีกิจกรรมการหมักสูง (pH 4.1-4.7) มีจำนวนแบคทีเรียไอโซเลทมากกว่าการคัดแยกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีกิจกรรมการหมักต่ำกว่า (pH 4.5-4.9) ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม โดยส่วนใหญ่ถูกนำมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์

อาหารหมักจากพืชและสัตว์ เช่น ผักดอง พืชอาหารสัตว์หมัก แป้งหมัก ไข่กรอบหมักแห้ง ปลาหมัก เนยแข็ง (Ishak *et al.*, 2017) อาหารหมักพื้นบ้านของไทย (Bumrungpukdee and Leenanon, 2011; Keereewan, 2015; Imtongkhum, 2018) น้ำอ้อย (Sobrun *et al.*, 2012) และมูลสัตว์ (Rueangyotchanthana, 2013) เป็นต้น

**ตารางที่ 1** สันฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหารหมักดองและมูลสัตว์

| แหล่งคัดแยก | ไอโซเลท | ชนิดแกรม | รูปร่างและการจัดเรียงเซลล์                      | การทดสอบ<br>กะตะเลส | การเคลื่อนที่ | การหมักน้ำตาล                 |
|-------------|---------|----------|-------------------------------------------------|---------------------|---------------|-------------------------------|
| หอยดอง      | LAB 1   | แกรมบวก  | ท่อนสั้น อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเรียงตัวเป็นสาย | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 2   | แกรมบวก  | ท่อนสั้น อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม       | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 3   | แกรมบวก  | ท่อนสั้น อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม       | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>สร้างแก๊ส    |
|             | LAB 4   | แกรมบวก  | ท่อนสั้น อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม       | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>สร้างแก๊ส    |
|             | LAB 5   | แกรมบวก  | ท่อนสั้น อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเรียงตัวเป็นสาย | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 6   | แกรมบวก  | ท่อนสั้น อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม       | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>สร้างแก๊ส    |
|             | LAB 7   | แกรมบวก  | ท่อนสั้น อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นกลุ่ม       | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>สร้างแก๊ส    |
|             | LAB 8   | แกรมบวก  | ท่อนสั้น ส่วนใหญ่อยู่เป็นกลุ่มหนาแน่น           | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>สร้างแก๊ส    |
|             | LAB 9   | แกรมบวก  | ท่อนสั้น ส่วนใหญ่อยู่เป็นกลุ่มหนาแน่น           | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>สร้างแก๊ส    |
|             | LAB 10  | แกรมบวก  | ท่อนสั้น ส่วนใหญ่อยู่เป็นกลุ่มหนาแน่น           | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>สร้างแก๊ส    |
|             | LAB 11  | แกรมบวก  | ท่อนสั้น ส่วนใหญ่อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว            | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>สร้างแก๊ส    |
|             | LAB 12  | แกรมบวก  | ท่อนสั้น ส่วนใหญ่อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว            | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>สร้างแก๊ส    |
|             | LAB 13  | แกรมบวก  | ท่อนสั้น ส่วนใหญ่อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว            | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>สร้างแก๊ส    |
|             | LAB 14  | แกรมบวก  | ท่อนสั้น ส่วนใหญ่อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว            | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>สร้างแก๊ส    |

ตารางที่ 1 (ต่อ)

| แหล่งคัดแยก | ไอโซเลท | ชนิดแกรม | รูปร่างและ<br>การจัดเรียงเซลล์                        | การทดสอบ<br>กะตะเลส | การเคลื่อนที่ | การหมักน้ำตาล                 |
|-------------|---------|----------|-------------------------------------------------------|---------------------|---------------|-------------------------------|
| ແຮມມ        | LAB 15  | แกรมบวก  | ท่อนสั้น ส่วนใหญ่อยู่เป็น<br>เซลล์เดี่ยว              | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>สร้างแก๊ส    |
|             | LAB 16  | แกรมบวก  | ท่อนสั้น อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว<br>และเป็นกลุ่มหนาแน่น   | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 17  | แกรมบวก  | ท่อนสั้น อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว<br>และเป็นกลุ่มหนาแน่น   | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 18  | แกรมบวก  | ท่อนสั้น ส่วนใหญ่อยู่เป็น<br>เซลล์เดี่ยว              | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>สร้างแก๊ส    |
|             | LAB 19  | แกรมบวก  | ท่อนยาว เรียงตัวเป็นสาย                               | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 20  | แกรมบวก  | ท่อนสั้น อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว<br>หรือเป็นกลุ่ม         | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>สร้างแก๊ส    |
|             | LAB 21  | แกรมบวก  | ท่อนยาว ส่วนใหญ่อยู่เป็น<br>กลุ่ม                     | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>สร้างแก๊ส    |
|             | LAB 22  | แกรมบวก  | ท่อนยาว ส่วนใหญ่อยู่เป็น<br>กลุ่ม                     | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>สร้างแก๊ส    |
|             | LAB 23  | แกรมบวก  | ท่อนยาว เรียงตัวเป็นสาย                               | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 24  | แกรมบวก  | ท่อนยาว ส่วนใหญ่อยู่เป็น<br>เซลล์เดี่ยว               | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 25  | แกรมบวก  | ท่อนยาว อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว<br>และเรียงตัวเป็นสายสั้น | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 26  | แกรมบวก  | ท่อนยาว อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว<br>และเรียงตัวเป็นสายสั้น | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 27  | แกรมบวก  | ท่อนยาว อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว<br>และเรียงตัวเป็นสายสั้น | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 28  | แกรมบวก  | ท่อนยาว อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว<br>และเรียงตัวเป็นสายสั้น | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 29  | แกรมบวก  | ท่อนยาว เรียงตัวเป็นสาย                               | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 30  | แกรมบวก  | ท่อนสั้น อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว<br>และเป็นกลุ่ม          | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 31  | แกรมบวก  | ท่อนสั้น ส่วนใหญ่อยู่เป็น<br>เซลล์เดี่ยว              | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 32  | แกรมบวก  | ท่อนยาว ส่วนใหญ่เรียงตัว<br>เป็นสาย                   | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 33  | แกรมบวก  | ท่อนยาว อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว<br>และเรียงตัวเป็นสาย     | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |



ตารางที่ 1 (ต่อ)

| แหล่งคัดแยก | ไอโซเลท | ชนิดแกรม | รูปร่างและ<br>การจัดเรียงเซลล์                      | การทดสอบ<br>กะตะเลส | การเคลื่อนที่ | การหมักน้ำตาล                 |
|-------------|---------|----------|-----------------------------------------------------|---------------------|---------------|-------------------------------|
|             | LAB 53  | แกรมบวก  | ท่อนสั้น อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว<br>หรือเรียงตัวเป็นคู่ | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 54  | แกรมบวก  | ท่อนสั้น อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว<br>และเป็นกลุ่ม        | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 55  | แกรมบวก  | ท่อนสั้น อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว<br>และเป็นกลุ่ม        | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |
|             | LAB 56  | แกรมบวก  | ท่อนสั้น อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว<br>และเป็นกลุ่ม        | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>สร้างแก๊ส    |
|             | LAB 57  | แกรมบวก  | ท่อนสั้น อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว<br>และเป็นกลุ่ม        | -                   | ไม่เคลื่อนที่ | หมักน้ำตาลได้<br>ไม่สร้างแก๊ส |

## 2. ผลการศึกษาฐานวิธานวิทยาและการทดสอบทาง

### ชีวเคมี

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้งหมด เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนสั้นและท่อนยาว มีทั้งเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นกลุ่ม และเรียงตัวเป็นสาย ไม่สร้างสปอร์ ให้ผลลบในการทดสอบการสร้างเอนไซม์กะตะเลส ซึ่งลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับที่มีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (Sáez *et al.*, 2018) ผลิตภัณฑ์นม (Tallapragada *et al.*, 2018) และมูลสัตว์ (Prittesh and Vrutika, 2015) จากการทดสอบการเคลื่อนที่พบว่าแบคทีเรียไอโซเลทที่แยกได้มีการเจริญตามแนวเข็มเข็มเชื้อเท่านั้น แสดงว่าแบคทีเรียไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ จากการทดสอบการหมักน้ำตาลกลูโคสพบว่าแบคทีเรียที่สามารถสร้างแก๊สได้ จำนวน 21 ไอโซเลท และไม่สร้างแก๊ส จำนวน 36 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) ซึ่งการทดสอบแก๊สที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสสามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติก ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ Homofermentative และ Heterofermentative (Halász, 2019) โดยกลุ่ม Homofermentative จะให้ผลผลิตหลักเป็นกรดแลคติกจากการหมักน้ำตาลเฮกโซส

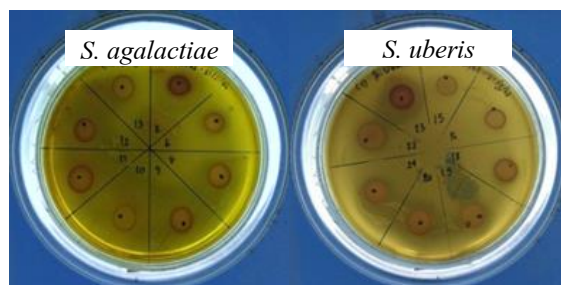
(hexose) ในขณะที่กลุ่ม Heterofermentative จะให้กรดแลคติก แอลกอฮอล์ และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Basso *et al.*, 2014) จากข้อมูลของ Biological Resource Center, NITE ประเทศญี่ปุ่น (NBRC, 2019) รายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติก รูปร่างแท่งที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์หมักในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในจีนัส *Weissella* spp. ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ Heterofermentative และจีนัส *Lactobacillus* spp. ซึ่งมีทั้งที่อยู่ในกลุ่มของ Homofermentative และ Heterofermentative

### 3. ผลการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* และ *S. uberis* ด้วยวิธี Agar spot test

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae* และ *S. uberis* ด้วยวิธี Agar spot test พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 36 ไอโซเลท (คัดแยกจากหอยดอง 13 ไอโซเลท หมานม 19 ไอโซเลท มูลสุกร 1 ไอโซเลท และมูลโค 3 ไอโซเลท) ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในขณะที่แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 32 ไอโซเลท (คัดแยกจากหอยดอง 11 ไอโซเลท หมานม 17 ไอโซเลท มูลสุกร 1 ไอโซเลท และมูลโค

3 ไอโซเลท) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. uberis* (ภาพที่ 1) การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. agalactiae* และ *S. uberis* มีรายงานการศึกษาในแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus* spp.,

*Lactococcus* spp. และ *Weissella confusa* คัดแยกได้จากของเหลวในกระเพาะส่วนรูเมน (ruminal fluid) ของแม่วัวที่มีอาการท้องอืด (acidosis) (Serna *et al.*, 2011) และในน้ำนมโค (Bouchard *et al.*, 2015)



ภาพที่ 1 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* และ *S. uberis* ด้วยวิธี Agar spot test

#### 4. ผลการทดสอบแบคทีเรียโอซิน

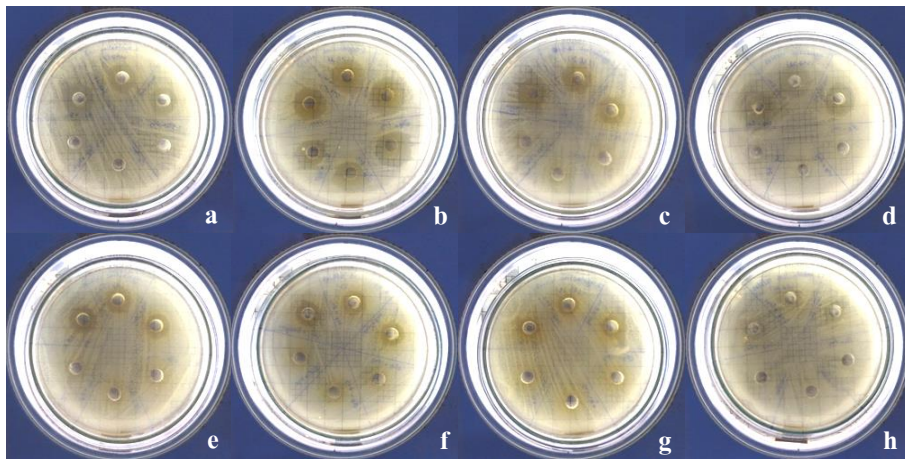
จากการทดสอบคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *S. agalactiae* และ *S. uberis* พบว่า CFNS จากแบคทีเรียไอโซเลท LAB 21, LAB 31 และ LAB 34 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยเกิดวงใสที่เด่นชัด (ภาพที่ 2) แต่อย่างไรก็ตามความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบลดลงหรือหมดไปเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียโอซินเป็นเปปไทด์จึงสามารถถูกย่อยสลายได้โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน สอดคล้องกับการศึกษาของ Kim *et al.* (2004) และ Imtongkhum (2018) ที่ทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรตีนของแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหมดไปเมื่อแบคทีเรียโอซินถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme)

CFNS ของแบคทีเรียไอโซเลท LAB 26 ยังคงแสดงกิจกรรมยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. agalactiae* และ *S. uberis* ได้ภายหลังจากที่เติมเอนไซม์ย่อยโปรตีน (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่าสาร

ออกฤทธิ์ที่พบในแบคทีเรียไอโซเลท LAB 26 ไม่ใช่สารเปปไทด์ เนื่องจากไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ดังนั้นกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากฤทธิ์ของสารประกอบชนิดอื่นที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น ได้แก่ สารเมแทบอไลต์น้ำหนักรวมโมเลกุลต่ำ เช่น กรดอินทรีย์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ กรดแลคติก กรดอะซิติก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ กรดไขมันสายสั้น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ไดอะซีติล (diacetyl) และรอยเทอริน (reuterin) เป็นต้น (Stoyanova *et al.*, 2012; King Mongkut's University of Technology North Bangkok, 2018)

#### 5. ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Streptococcus agalactiae* และ *S. uberis* ด้วยวิธี Agar well diffusion

แบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียไอโซเลท LAB 21, LAB 31 และ LAB 34 แสดงกิจกรรมยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* โดยทำให้เกิดวงใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 14.50, 12.15 และ 14.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ



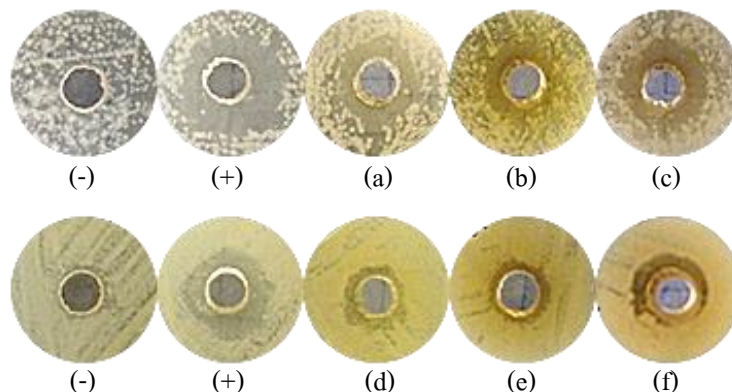
ภาพที่ 2 ผลการทดสอบด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนเพื่อยืนยันคุณสมบัติสารประกอบเปปไทด์ของสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* (a-d) และ *S. uberis* (e-h) ของแบคทีเรียกรดแลคติก LAB 21, LAB 26, LAB 31 และ LAB 34 (จากซ้ายไปขวา)

และแสดงกิจกรรมยับยั้งเชื้อ *S. uberis* โดยทำให้เกิดวงใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 10.75, 10.50 และ 11.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ภาพที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของวงใสที่เกิดการยับยั้งเชื้อทดสอบระหว่างที่เกิดจากยาปฏิชีวนะอะม็อกซิซิลลินและแบคทีเรียโอซิน พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของวงใสที่เกิดการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* โดยยาปฏิชีวนะอะม็อกซิซิลลินมีขนาด 17 มิลลิเมตร ซึ่งไม่แตกต่างจากขนาดของวงใสที่เกิดการยับยั้งจากแบคทีเรียโอซิน LAB 21 และ LAB 34 ในขณะที่เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของวงใสที่เกิดการยับยั้งเชื้อ *S. uberis* โดยยาปฏิชีวนะอะม็อกซิซิลลินมีขนาด 15.50 มิลลิเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าวงใสที่เกิดการยับยั้งจากแบคทีเรียโอซิน LAB 21, LAB 31 และ LAB 34 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 2) มีรายงานการศึกษาความต้านทานของเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบต่อสารต้านจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่ามีความสัมพันธ์กับยีนต้านทาน (resistant

genes) ซึ่งเป็นผลจากการใช้ยาปฏิชีวนะ ในปริมาณมาก (Ding *et al.*, 2015; Kaczorek *et al.*, 2017; Tomazi *et al.*, 2019) อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียโอซิน เช่น ไนซิน ยังคงมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อดังกล่าว (Kaczorek *et al.*, 2017) มีรายงานการวิจัยหลายเรื่องที่ศึกษาถึงมีการศึกษาที่แสดงถึงแบคทีเรียกรดแลคติก (Serna *et al.*, 2011; Bouchard *et al.*, 2015; Diepers *et al.*, 2017; Martín *et al.*, 2019; Pellegrino *et al.*, 2019) และแบคทีเรียโอซินที่สังเคราะห์โดยแบคทีเรียกรดแลคติก (Geetha *et al.*, 2015; Gaspar *et al.*, 2018; Godoy-Santos *et al.*, 2019) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. agalactiae* และ *S. uberis* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบ ซึ่งนอกจากการสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคแล้วแบคทีเรียกรดแลคติกยังมีกลไกอื่นๆ ในการควบคุมเชื้อก่อโรค เช่น การแข่งขันเพื่อแย่งอาหาร การกีดขวางการยึดเกาะ และการปรับระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ เป็นต้น (Vieco-Saiz *et al.*, 2019) ดังนั้น การ

ใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อควบคุมโรคเต้านม  
อักเสบจึงอาจใช้ในรูปแบบของ โพรไบโอติกโดยผสมลง  
ในอาหารสัตว์ หรือใช้ในรูปแบบของแบคทีเรียโอซินโดย

ใช้เป็นน้ำยาจุ่มหัวนม (teat dip) หรือยาทรายสอดเต้านม



**ภาพที่ 3** ผลการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* (บน) และ *S. uberis* (ล่าง) ของแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรีย LAB 21 (a, d), LAB 31 (b, e) และ LAB 34 (c, f) โดยใช้อาหารเหลว MRS เป็นชุดควบคุมลบ (-) และยาปฏิชีวนะอะม็อกซิซิลลินเป็นชุดควบคุมบวก (+) ทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion

**ตารางที่ 2** ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของวงใสที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. agalactiae* และ *S. uberis* โดยแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้เปรียบเทียบกับยาปฏิชีวนะอะม็อกซิซิลลิน ทดสอบด้วยวิธี Agar spot test

| เชื้อทดสอบ           | ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (มิลลิเมตร) |                           |                           |                            |
|----------------------|------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
|                      | อะม็อกซิซิลลิน                           | แบคทีเรียโอซิน            |                           |                            |
|                      |                                          | LAB 21                    | LAB 31                    | LAB 34                     |
| <i>S. agalactiae</i> | 17.00 <sup>a</sup> ±0.14                 | 14.50 <sup>ab</sup> ±0.07 | 12.15 <sup>b</sup> ±0.02  | 14.00 <sup>ab</sup> ±0.00  |
| <i>S. uberis</i>     | 15.50 <sup>a</sup> ±0.07                 | 10.75 <sup>d</sup> ±0.04  | 10.50 <sup>cd</sup> ±0.07 | 11.50 <sup>bcd</sup> ±0.07 |

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในช่วงความเชื่อมั่น 95% ( $p \leq 0.05$ )

## สรุป

แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท LAB 21, LAB 31 และ LAB 34 ที่คัดแยกได้จากແໜ່ນແມ່เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ มีทั้งชนิดที่สร้างและไม่สร้างแก๊สจากการหมักน้ำตาลกลูโคส สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนม โดยแบคทีเรียโอซินที่สร้างขึ้นจาก

แบคทีเรีย LAB 21 และ LAB 34 แสดงกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. agalactiae* ได้ไม่แตกต่างจากยาปฏิชีวนะอะม็อกซิซิลลิน ในขณะที่แบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. uberis* น้อยกว่ายาปฏิชีวนะอะม็อกซิซิลลิน จากผลการศึกษาในครั้งนี้จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้แบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกในการทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคเต้านม

นมอัสเสบ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาในด้านคุณภาพของ  
น้ำนมดิบและการดื้อยาของเชื้อก่อโรค โดยอาจใช้ใน  
รูปของโพรไบโอติกผสมในอาหารหรือใช้จุ่มหัวนม  
หรือสอดเต้านม

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม  
ภายใต้โครงการวิจัยบูรณาการนักศึกษาและอาจารย์  
เพื่อการพัฒนาท้องถิ่นและความเป็นเลิศทางวิชาการ

### เอกสารอ้างอิง

- Ahmed, Z., Wang, Y., Cheng, Q. and Imran, M. 2010. *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: an overview. **African Journal of Biotechnology** 9(20): 2843-2850.
- Basso, T.O., Gomes, F.S., Lopes, M.L., Amorim, H.V., Eggleston, G. and Basso, L.C. 2014. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek** 105: 169-177.
- Bouchard, D.S., Seridan, B., Saraoui, T., Rault, L., Germon, P., Gonzalez-Moreno, C., Nader-Macias, F.M., Baud, D., François, P., Chuat, V., Chain, F., Langella, P., Nicoli, J., Le Loir, Y. and Even, S. 2015. Lactic acid bacteria isolated from bovine mammary microbiota: Potential allies against bovine mastitis. **PLoS One** 10(12): 1-18.
- Bumrungpukdee, T. and Leenanon, B. 2011. Isolation and identification of lactic acid bacteria from fermented bamboo shoots to be used as mixed starter cultures for fermentation, pp. 735-741. **In The 12th Graduate Research Conference.** Khon Kaen University, Khon Kaen. (in Thai)
- Butprom, S. 2013. Effect of teat seal on mastitis prevention in dry cows. Master of Science (Animal Production Technology), Suranaree University of Technology. (in Thai)
- Carson, D.A., Barkema, H.W., Naushad, S. and De Buck, J. 2017. Bacteriocins of non-*aureus* staphylococci isolated from bovine milk. **Applied and Environmental Microbiology** 83(17): 1-21.
- Chanlun, A. 2011. **The use of the dry cow therapy in the control of mastitis.** Available Source: [http://vet.kku.ac.th/aran/data/clinic4\\_2554/04\\_DC2554.pdf](http://vet.kku.ac.th/aran/data/clinic4_2554/04_DC2554.pdf), October 7, 2019.
- Costa, R., Voloski, F., Rafael, M., Duval, E. and Fiorentini, A. 2019. Preservation of meat products with bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from meat. **Journal of Food Quality** 2019: 1-12.
- Diepers, A., Krömker, V., Zinke, C., Wente, N., Liying, P., Paulsen, K. and Paduch, J. 2017. In vitro ability of lactic acid bacteria to inhibit mastitis-causing pathogens. **Sustainable Chemistry and Pharmacy** 5: 84-92.
- Ding, Y., Zhao, J., He, X., Li, M., Guan, H., Zhang, Z. and Li, P. 2015. Antimicrobial resistance and virulence-related genes of *Streptococcus* obtained from dairy cows

- with mastitis in Inner Mongolia, China. **Pharmaceutical biology** 54(1): 1-6.
- Gaspar, C., Donders, G., Palmeira de Oliveira, R., Queiroz, J., Tomaz, C., Martinez-de-Oliveira, J. and Palmeira-de-Oliveira, A. 2018. Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. **AMB Express** 8: 1-8.
- Geetha, R., Sathian, C.T., Prasad, V. and Gleeja, V.L. 2015. Efficacy of purified antimicrobial peptides from lactic acid bacteria against bovine mastitis pathogens. **Asian Journal of Dairy and Food Research** 34(4): 259-264.
- Godoy-Santos, F., Pinto, M.S., Barbosa, A., Brito, M. and Mantovani, H. 2019. Efficacy of a ruminal bacteriocin against pure and mixed cultures of bovine mastitis pathogens. **Indian Journal of Microbiology** 59(3): 304-312.
- Halász, A. 2019. **Lactic Acid Bacteria**. Encyclopedia of life support systems. Available Source: <https://www.eolss.net/Sample-Chapters/C10/E5-08-06-04.pdf>, October 8, 2019.
- Imtongkhum, K. 2018. Isolation of bacteriocin producing lactic acid bacteria for extending the shelf life of food. Master of Science (Applied Biology), Rajamangala University of Technology Thanyaburi. (in Thai)
- Ishak, M.S., Ibrahim, M.Z., and Ishak, H.M. 2017. Screening of lactic acid bacteria from “TapaiPulut” for biosynthesis of glutamic acid. **Modern Agricultural Science and Technology** 3(5-6): 37-41.
- Kaczorek, E., Małaczewska, J., Wojcik, R., Rękawek, W. and Siwicki, A. 2017. Phenotypic and genotypic antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus* spp. isolated from cases of clinical mastitis in dairy cattle in Poland. **Journal of Dairy Science** 100(8): 6442-6453.
- Kajaysri, J., Jasanchuen, A., Mitchaothai, J. and Thammakarn, C. 2014. The efficiency of Mastivac® vaccine for preventive mastitis in dairy cow. **Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine** 9(1): 37-48. (in Thai)
- Kalińska, A., Gołębiewski, M. and Wójcik, A. 2017. Mastitis pathogens in dairy cattle - a review. **World Scientific News** 89: 22-31.
- Keereewan, P. 2015. Selection of lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* from Thai fermented food for conjugated linoleic acid production. Master of Science (Biotechnology), Thammasat University. (in Thai)
- Kim, H.J., Kim, J.H., Son, J.H., Seo, H.J., Park, S.J., Paek, N.S. and Kim, S.G. 2004. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 14(3): 503-508.
- King Mongkut's University of Technology North Bangkok. 2018. **Chapter 39 Information of biochemical substances (Lactic acid)**. Database enhancement project of bio-based

- industries: Final report. Available Source: [http://asp.plastics.or.th:8001/files/article\\_file/20181016080519u.pdf](http://asp.plastics.or.th:8001/files/article_file/20181016080519u.pdf), November 3, 2019. (in Thai)
- Lakshmi, R. 2016. Bovine mastitis and its diagnosis. **International Journal of Applied Research** 2(6): 213-216.
- León-Galván, M.F., Barboza-Corona, J.E., Lechuga-Arana, A.A., Valencia-Posadas, M., Aguayo, D.D., Cedillo-Pelaez, C., Martínez-Ortega, E.A. and Gutierrez-Chavez, A.J. 2015. Molecular detection and sensitivity to antibiotics and bacteriocins of pathogens isolated from bovine mastitis in family dairy herds of central Mexico. **BioMed Research International** 2015: 1-9.
- Luangwilai, M. 2017. Comparison of biomolecular profile of raw milk from clinical and subclinical mastitis cows using metabolomics technology. Master of Science (Food Technology), Chulalongkorn University. (in Thai)
- Martín, V., Cárdenas, N., Ocaña, S., Marin, M., Arroyo, R., Beltrán, D., Badiola, C., Fernández, L. and Rodríguez, J. 2019. Rectal and vaginal eradication of *Streptococcus agalactiae* (GBS) in pregnant women by using *Lactobacillus salivarius* CECT 9145, a target-specific probiotic strain. **Nutrients** 11: 1-22.
- Mokoena, M.P. 2017. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. **Molecules** 22(8): 1255-1267.
- National Institute of Animal Health. 2006. **Mastitis**. Animal Disease. Available Source: [http://niah.dld.go.th/th/AnimalDisease/cow\\_mas.htm](http://niah.dld.go.th/th/AnimalDisease/cow_mas.htm), December 5, 2019. (in Thai)
- NBRC. 2019. **Lactic acid bacteria isolated from fermented food in Thailand**. National Institute of Technology and Evaluation. Available Source: <https://WWW.nite.go.jp/en/nbrc/cultures/nbrc/use/thailact.html>, October 28, 2019.
- Panneum, S., Iniam, K., Choorut, P., Bumrungrit, K., Sroynum, A. and Pinyopummin, A. 2007. Identification of clinical mastitis pathogens and antibiotic sensitivity in dairy cattle during years 2004-2006 in Kanchanaburi, Nakhonpathom and Ratchaburi, pp. 532-538. In **45th Kasetsart University Annual Conference: Animals and Veterinary Medicine**. Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Pellegrino, M., Frola, I., Natanael, B., Gobelli, D., Nader-Macias, F. and Bogni, C. 2019. In vitro characterization of lactic acid bacteria isolated from bovine milk as potential probiotic strains to prevent bovine mastitis. **Probiotics and Antimicrobial Proteins** 11(1): 74-84.
- Pieterse, R. and Todorov, S.D. 2010. Bacteriocins - exploring alternatives to antibiotics in mastitis treatment. **Brazilian Journal of Microbiology** 41: 542-562.
- Pieterse, R., Todorov, S.D. and Leon, M.T.D. 2010. Mode of action and In Vitro susceptibility

- of mastitis pathogens to macedocin ST91KM and preparation of a teat seal containing the bacteriocin. **Brazilian Journal of Microbiology** 41: 133-145.
- Prittesh, P. and Vrutika, L. 2015. Isolation of lactic acid bacteria from different dung samples and *In Vitro* screening for certain probiotic properties. **International Journal of Scientific Research and Reviews** 4(1): 41-49.
- Rueangyotchanthana, K. 2013. Screening of lactic acid bacteria isolated from animal feces for multistrains probiotics and their application in chickens. Master of Science (Biotechnology), Srinakharinwirot University. (in Thai)
- Sáez, G.D., Flomenbaum, L. and Zárate, G. 2018. Lactic acid bacteria from Argentinean fermented foods: Isolation and characterization for their potential use as starters for fermentation of vegetables. **Food Technology & Biotechnology** 56(3): 398-410.
- Serna, L., Valencia, L.Y. and Campos, R. 2011. Lactic acid bacteria with antimicrobial activity against pathogenic agent causing of bovine mastitis. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial** 9(1): 97-104.
- Siripoke, S., Aungpraphapornchai, P., Pothivejkul, K. and Pringsulaka, O. 2007. Screening and identification of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from fermented foods and preliminary characterization of the bacteriocin. **Srinakharinwirot Science Journal** 23(2): 92-114.
- Sobrun, Y., Bhaw-Luximon, A., Jhurry, D. and Puchooa, D. 2012. Isolation of lactic acid bacteria from sugar cane juice and production of lactic acid from selected improved strains. **Advances in Bioscience and Biotechnology** 3: 398-407.
- Stoyanova, L.G., Ustyugova, E.A. and Netrusov, A.I. 2012. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: Their diversity and properties. **Applied Biochemistry and Microbiology** 48: 229-243.
- Tallapragada, P., Bhargavi, R., Priyanka, P., Niranjana, N. and Pavitra, P. 2018. Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology** 16: 357-362.
- Tangwatcharin, P., Nithisanthawakupt, J. and Suksupath, K. 2017. Preliminary screening and selection of lactic acid bacteria with potential probiotic properties from fermented meat product. **King Mongkut's Agricultural Journal** 4(2): 67-76. (in Thai)
- Tomazi, T., Freu, G., Alves, B., de Souza Filho, A., Heinemann, M. and Santos, M. 2019. Genotyping and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* isolated from bovine clinical mastitis. **PloS One** 14(10): 1-15.
- Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I. and

Drider, D. 2019. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. **Frontiers in Microbiology** 10(57): 1-17.