

ความทนทานพีเอชของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารออกฤทธิ์ต้านรา

มณฑล เลิศคณาวินกุล* รัชฎาภรณ์ รักหวาน รัตนี อีเต รุสนะ ดุติง

บทคัดย่อ

แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 4 ตัวอย่าง (L14 L25 L26 และ L31) สามารถวินิจฉัยแยกชนิดด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHL ได้เป็น *Pediococcus pentosaceus* 1, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 และ *Pediococcus acidilactici* ตามลำดับ โดยทุกตัวอย่างสามารถออกฤทธิ์ต้านราที่ใช้เป็นดัชนีทุกชนิดได้แก่ *Rhizopus* spp., *Aspergillus* spp. และ *Candida albicans* เมื่อทดสอบด้วยวิธี double layer (overlay) แต่ไม่ให้ออกฤทธิ์ดังกล่าวเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion ซึ่งอาจเนื่องมาจากความไม่เสถียรของเมตาบอไลต์หรือขนาดโมเลกุลของเมตาบอไลต์ เป็นต้น แบคทีเรียกรดแลคติกทุกตัวอย่างที่นำมาศึกษาสามารถเจริญได้ที่ช่วง pH 4-11 ซึ่งอาจนำไปใช้เป็น probiotic ได้ เพราะสามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นกรดและสภาวะที่ค่อนข้างด่าง ซึ่งมีความสัมพันธ์กับกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กในร่างกายนมนุษย์

คำรหัส : แบคทีเรียกรดแลคติก รา

บทนำ

ราหลายชนิดสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วไป และในร่างกายมนุษย์ โดยไม่ได้เป็นสาเหตุของโรคในคนปกติ เช่น *Candida albicans* พบเป็นเชื้อประจำถิ่นในช่องคลอดผู้หญิง เยื่อช่องปากและทางเดินอาหาร พบเป็นสาเหตุของโรค Candidiasis ซึ่งเป็นโรคฉวยโอกาสในกลุ่มผู้ป่วยกลุ่มเสี่ยง เช่น ผู้ป่วยติดเชื้อไวรัส HIV ผู้ที่ผ่าตัดเปลี่ยนอวัยวะ กลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านแบคทีเรียเป็นระยะเวลานาน เป็นต้น นอกจากนี้รามีบางชนิดในกลุ่ม *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp. และ *Fusarium* spp. ยังสามารถสร้างสารพิษ (mycotoxin) ที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ เช่น Aflatoxin, Trichothecenes, Fumonisin และ Ochratoxin A ซึ่งยาที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อราที่ใช้อยู่ในปัจจุบันนี้ไม่ครอบคลุมรา

ทุกชนิดและยังก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาตามมา รวมทั้งอาจมีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาโรคติดเชื้อราในระบบต่างๆ ของร่างกาย (systemic fungal infection) เช่น เกิดอาการไตวาย กดไขกระดูก electrolyte ผิดปกติ มีอาการไข้ เป็นต้น แม้ว่าในปัจจุบันนี้จะมีการคิดค้นยาตัวใหม่ขึ้นมาใช้ในการรักษา แต่ก็พบว่าเมื่อใช้ยารักษาเป็นระยะเวลานานๆ ก็จะพบอัตราการดื้อยาของเชื้อเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นเพื่อลดปัญหาดังกล่าวจึงได้มีความพยายามคิดค้นแนวทางใหม่ๆ ในการรักษาผู้ป่วยติดเชื้อรา เช่น การใช้สมุนไพรรักษา⁽¹⁾ การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก⁽²⁾ ที่สามารถผลิตชีวสารในการยับยั้งการเจริญหรือทำลายรา แต่พบมีรายงานอยู่น้อย⁽³⁾ ซึ่งฤทธิ์ในเบื้องต้นอาจเนื่องมาจากกรดที่เชื้อผลิตออกมาจากกระบวนการเมตาบอไลต์น้ำตาลกลูโคสและสามารถแบ่ง

สำนักวิทยาศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80160

* ผู้รับผิดชอบบทความ

pH Tolerance of antifungal producing lactic acid bacteria

Monthon Lertcanawanichakul *, Ratchadaporn Rakwhan, Rasnee Etaa, Rusnah Duding

Abstract

Four isolates of lactic acid bacteria (LABs), i.e. L14, L25, L26 and L31, were identified as *Pediococcus pentosaceus* 1, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 and *Pediococcus acidilactici*, respectively, using the biochemical commercial test kit, API50CHL. All isolates were screened for the presence to study on effect of antifungal activity against indicator fungi (*Rhizopus* spp., *Aspergillus* spp. and *Candida albicans*) by means of double layer (over lay) and agar well diffusion. The results revealed that all of them inhibited the growth of all fungi by the overlay method, but no growth inhibition was observed when using culture broth. This may be because of the instability of metabolites and molecular weight of metabolites, etc. However, these isolates may be used as probiotics because they can resist to acidic or basic conditions ranging from pH 4 to pH 11, similar to environmental conditions in human stomach and intestine.

Key Words: Lactic acid bacteria Fungi

กลุ่มเชื้อออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามความแตกต่างของผลผลิตที่เชื้อผลิตออกมา คือ homofermentative และ heterofermentative โดยกลุ่ม homofermentative จะเมตาบอไลต์กลูโคสได้กรดแลคติก (ร้อยละ 85 - 95)⁽⁴⁾ ส่วน heterofermentative จะเมตาบอไลต์กลูโคสได้เอทานอล และ คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) เป็นหลัก รวมทั้งได้กรดแลคติก⁽⁵⁾ ซึ่งโดยส่วนใหญ่ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราที่ผลิตออกมาโดยเชื้อในกลุ่มของ heterofermentative จะเป็นคุณสมบัติของกรดแลคติก หรืออะซิติก⁽⁶⁾ รวมถึงเมตาบอไลต์ต่างๆ⁽⁷⁾ เช่น แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) อะเซทาลดีไฮด์ (acetaldehyde) ไดอะซีทิล (diacetyl) รูเทอริน (reuterin) เป็นต้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายังมีชีวสารกลุ่มอื่นนอกเหนือจากกรด

ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา จึงได้ศึกษาฤทธิ์ของเมตาบอไลต์จากแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของรา (*Candida albicans*, *Aspergillus* spp., และ *Rhizopus* spp.) รวมทั้งความทนทานต่อระดับ pH ต่างๆ ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ เพื่อให้ได้สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการทำยาร ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้ในด้านการศึกษาต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

1. แบคทีเรียทดสอบ

แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ต้านราที่แยกได้จากผู้ป่วย ได้แก่ *Aspergillus* spp. และ *Rhizopus* spp

School of Allied Health Sciences and Public Health, Walailak University, Nakhon Si Thammarat 80160

* Corresponding author (e-mail: lmonthon@wu.ac.th)

โดยได้รับความอนุเคราะห์เชื้อจากโรงพยาบาลมหาราช
จังหวัดนครราชสีมา และ *Candida albicans* TISTR
5239 ซึ่งซื้อจาก สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
แห่งประเทศไทย

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติก
ได้แก่ Mann, Rogosa, Sharpe (MRS: Pronadisa,
Madrid, Spain) อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยงรา
ได้แก่ Sabauroud Dextrose (SD) agar/broth
(Pronadisa, Madrid, Spain) และอาหารเลี้ยงเชื้อ
ทดสอบทางชีวเคมีสำหรับรา ได้แก่ พลาสมา ใช้ทดสอบ
การงอกของท่ออก (germ tube) ยูเรียใช้ทดสอบ
เอนไซม์ยูเรียเอส สำหรับชุดทดสอบวินิจัยแยกชนิด
แบคทีเรียกรดแลกติกได้แก่สารละลาย API 50 CH ใช้
เตรียมสารแขวนลอย (suspension) ของแบคทีเรียกรด
แลกติกให้มีความเข้มข้นเทียบเท่า McFarland No.2 และ
ชุดทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHL (Biomérieux, La
Balme, Les Grottes, France) ใช้สำหรับวินิจัยแยก
ชนิดแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยการดูการใช้คาร์โบไฮเดรต
ชนิดต่าง ๆ

3. สารเคมี

0.85 % NaCl ใช้สำหรับเตรียมสารแขวนลอย
รา 3 % H₂O₂ ใช้สำหรับทดสอบเอนไซม์ คีตาเลส
McFarland No. 0.5 เป็นสารมาตรฐานใช้ปรับเทียบ
ความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้อให้มีปริมาณของเชื้อ
ประมาณ 1.5×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร 15 % glycerol
ใช้สำหรับเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส
ชุดสีย้อมแกรมสำหรับย้อมแบคทีเรียและชุดสีย้อมรา
lacto phenol cotton blue

4. วัสดุอุปกรณ์

pH meter (HACH Sension3, Loveland, CO,
USA) เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิได้
(Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany) กระดาษ
กรองขนาดรูผ่าน 0.45 ไมโครเมตร (Millipore,
Billerica, MA, USA)

5. การเตรียมแบคทีเรียกรดแลกติกและรา

บ่มเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกจำนวน 40
ตัวอย่าง (isolate) ที่ได้จากการศึกษาของมณฑล เลิศ
คณาวนิชกุล⁽⁸⁾ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่อุณหภูมิ
37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่บรรยากาศ 5-10 % CO₂
(candle jar) สุ่มเลือกโคโลนีกลม นูน สีขาวขุ่น มา
ทดสอบยืนยันกลุ่มเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ได้แก่ ย้อม
สีแกรม และทดสอบเอนไซม์คีตาเลส ด้วย 3 % H₂O₂
โดยแบคทีเรียกรดแลกติกย้อมติดสีแกรมบวกและให้
ผลลบกับการทดสอบเอนไซม์คีตาเลส จากนั้นนำเชื้อ
ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวไปเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเชื้อ
เหลว MRS ที่สถานะเดิมข้างต้น แล้วแบ่งเก็บใส่ 15 %
glycerol เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อรอการทดสอบ

บ่มเพาะเลี้ยงรา *Aspergillus* spp. หรือ *Rhizopus*
spp. หรือ *Candida albicans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง
SDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หรือ จน
กระทั่งเชื้อเจริญขึ้นเป็นโคโลนีและสร้าง conidia หรือ
sporangiospore จากนั้นทำการยืนยันกลุ่มเชื้อโดย
สังเกตท่ออกของ *C. albicans* เมื่อเลี้ยงในพลาสมาที่
อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ส่วน *Aspergillus*
spp. หรือ *Rhizopus* spp. ให้สังเกตโครงสร้าง vesicle,
foot cell, conidiophore สำหรับ *Aspergillus* spp. หรือ
rhizoid, sporangiophore และ sporangiospore สำหรับ
Rhizopus spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 X

6. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีฤทธิ์ต้านรา

บ่มเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกทุกตัวอย่าง
ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็น
เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งการทดสอบเป็น 2 วิธี คือ

6.1 วิธี double layer (overlay)

ขีดแบคทีเรียกรดแลกติกแต่ละตัวอย่าง
ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่ได้แบ่งจาน
เพาะเชื้อออกเป็น 4 ส่วน ในบริเวณที่กำหนดในแต่ละส่วน
บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
เททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งกึ่งเหลว (soft agar) SD
ที่มีรายอยู่ประมาณ 107 เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มเลี้ยงเชื้อ
ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชม อ่านผลฤทธิ์ต้านรา

ด้วยการสังเกตวงใส (inhibition zone) รอบรอยขีด
แบคทีเรียกรดแลคติก

6.2 วิธี agar well diffusion

การเตรียมเมตาบอลไลต์จากแบคทีเรียกรด
แลคติก

นำโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มี
ฤทธิ์ต้านราได้มากที่สุดจากวิธี double layer มา
เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 10 มล
โดยปรับความขุ่นเริ่มต้นเทียบเท่ากับ McFarland No. 0.5
นำไปบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง
แล้วปั่นแยกเชื้อที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา
20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ นำน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture broth)
มาทดสอบยืนยันฤทธิ์ต้านราด้วยวิธี agar well diffusion

การเตรียมรา

เพาะเลี้ยงราสายในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง
SDA ในหลอดทดลองจนกระทั่งสร้างสปอร์ แล้วเติม
0.85% NaCl ปราศจากเชื้อลงไปปริมาตร 1 มิลลิตร
เพื่อชุดเอสปอร์ จากนั้นดูดใส่หลอดทดลองปราศจาก
เชื้อเพื่อทำการเจือจางสารแขวนลอยราให้มีปริมาณเซลล์
เท่ากับ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิตร และเตรียมสารแขวนลอย
รา *C. albicans* ให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland
No. 0.5 แล้วทำการเจือจางให้ได้ปริมาณเท่ากับราสาย

การศึกษาฤทธิ์ของเมตาบอลไลต์ด้วยวิธี
agar well diffusion

นำสารแขวนลอยรามาป้ายให้ทั่วพื้นผิวของ
อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง SDA ด้วยไม้พันสำลี (swab)
ปราศจากเชื้อตั้งทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง แล้วเจาะหลุมด้วย tip
ปราศจากเชื้อขนาด 1,000 ไมโครลิตร ให้มีขนาดเส้นผ่าน
ศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร และเนื้อวุ้นออกด้วย
เข็มเขี่ยปราศจากเชื้อ จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture
broth) หยดลงไปในแต่ละหลุมๆ ละประมาณ 100 มคค
ทิ้งไว้จนน้ำเลี้ยงเชื้อซึมผ่านเข้าเนื้อวุ้นจนหมด จากนั้นบ่ม
เลี้ยง *C. albicans* ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
และบ่มเลี้ยง *Rhizopus* spp. และ *Aspergillus* spp. ที่
อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านผลฤทธิ์ต้านราโดยดู
inhibition zone รอบหลุมที่หยอดน้ำเลี้ยงเชื้อ

7. การวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL

เลือกโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยก
เดี่ยวมาศึกษาลักษณะรูปร่างและทดสอบทางชีวเคมี ซึ่ง
ยึดตามแนวทางการจัดจำแนกแบคทีเรียจากหนังสือ
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology
Volume 2 ⁽⁹⁾ และนำมาทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรต
จำนวน 49 ชนิด ด้วยชุด API 50 CH system โดย
บ่มเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว
MRS ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วถ่าย
เชื้อใส่ centrifuge tube ปั่นด้วยความเร็วรอบ 5,000
rpm เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วนำตะกอน
เชื้อมาเตรียมเป็นสารแขวนลอยโดยปรับความขุ่นเทียบ
เท่ากับ McFarland No.2 ในสารละลาย API 50 CH
และนำไปทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบ
API 50 CHL ตามขั้นตอนการแนะนำของบริษัทโดยมี
ขั้นตอนโดยย่อดังนี้ : หยด suspension เชื้อลงใน API
50 CHL ในแต่ละหลุมๆ ละประมาณ 100-130
ไมโครลิตร ปิดทับด้วยน้ำมันพาราฟินเหลวที่ผ่านการ
ฆ่าเชื้อแล้ว บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 48
ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีแล้วนำไปวิเคราะห์
แยกชนิดโดยใช้ APILAB Plus software program

8. ศึกษาผลของ pH ต่อการเจริญของแบคทีเรีย กรดแลคติก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS และปรับ pH
ให้อยู่ในช่วง 2-11 ด้วย 2 M NaOH หรือ 0.6 M HCl
แบ่งอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ปรับ pH แล้วใส่ลง
ในหลอดทดลอง ปริมาตรหลอดละ 10 มล นำไป
autoclave ที่สภาวะ 121 °ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตา
รานี้ เป็นเวลา 12 นาที

การบ่มเลี้ยงเชื้อ

นำแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละตัวอย่างที่เลี้ยง
ไว้ข้ามคืนในอาหารเหลว MRS มาถ่ายใส่ลงในอาหาร
เลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ปรับ pH แล้ว ให้มีปริมาณเป็น
1% ของอาหารเลี้ยงเชื้อ พร้อมทำ negative control

(ไม่เติมเชื้อ) บ่มเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชม บันทึกผลการเจริญของเชื้อโดยดูจากความขุ่น จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปวัดค่า pH พร้อมบันทึกผล

ผลการศึกษา

1. การเตรียมเชื้อทดสอบ

1.1 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลคติก

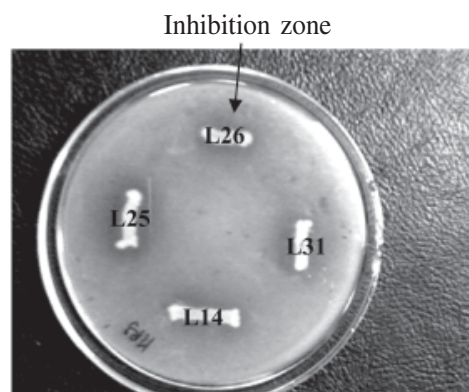
สามารถเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ได้จำนวน 4 ตัวอย่างได้แก่ L14 L25 L26 และ L31 โดยให้ลักษณะโคโลนีของ เชื้อในเบื่องตันเหมือนกัน กล่าวคือ โคโลนีมีลักษณะ กลมทูน ขอบเรียบ มันวาว สีขาวขุ่นและติดสีย้อมแกรมบวก รูปร่างกลมหรือ ท่อนสั้นและให้ผลลบกับการทดสอบเอนไซม์เคตาเลส

1.2 การเตรียมรา

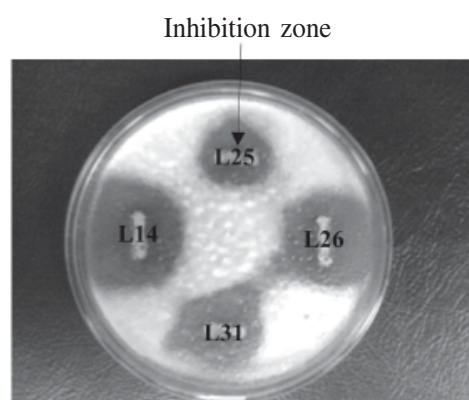
เพาะเลี้ยงราที่ใช้เป็นดัชนี (*Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp., หรือ *C. albicans*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง SD ปรากฏว่ามีเฉพาะ *C. albicans* ที่ให้ลักษณะเป็นเซลล์ยีสต์หรือราเซลล์เดี่ยว ส่วนราอีก 2 ชนิดมีลักษณะเป็นราสายหรือราหลายเซลล์ซึ่งสร้างสปอร์ที่เรียกว่า conidia หรือ sporangiospore โดยยืนยันได้ด้วยการย้อมสี lacto phenol cotton blue พบว่า *Aspergillus* spp. มีโครงสร้างของ vesicle และ conidiophore ส่วน *Rhizopus* spp. มีโครงสร้างของ sporangium และ sporangiophore สำหรับ *C. albicans* สังเกตเห็นท่องอกเมื่อเลี้ยงในพลาสมาเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C

2. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของรา โดยแบคทีเรียกรดแลคติก

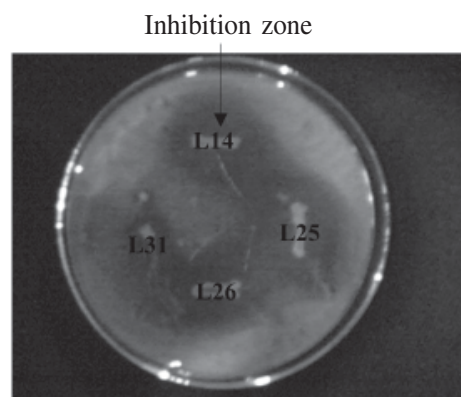
แบคทีเรียกรดแลคติกทุกตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านราทุกชนิด ได้แก่ *Candida albicans*, *Rhizopus* spp. หรือ *Aspergillus* spp. เมื่อทดสอบด้วยวิธี double layer (รูปที่ 1) แต่ไม่พบฤทธิ์ดังกล่าวเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion



ก



ข



ค

รูปที่ 1 ฤทธิ์ต้านรา *Candida albicans* (ก) *Aspergillus* spp. (ข) และ *Rhizopus* spp. (ค) ของแบคทีเรียกรดแลคติกตัวอย่างหมายเลข L14 L25 L26 และ L31 เมื่อทดสอบด้วยวิธี double layer ลูกศรชี้แสดงวงใสรอบรอยขีดของแบคทีเรียกรดแลคติก

3. การวินิจฉัยแยกชนิดแบคทีเรียกรดแลคติก ด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกตัวอย่าง หมายเลข L14 L25 L26 และ L31 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เพื่อวินิจฉัยแยกชนิดของเชื้อโดยการนำไปทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตในชุดทดสอบ API 50 CHL ปรากฏว่าเชื้อส่วนใหญ่สามารถย่อยน้ำตาล L-Arabinose, D-Ribose, D-Xylose, D-Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, N-Acetylglucosamine, Amygdalin, Arbutin, Esculin ferric citrate, Salicin, D-Cellobiose และ D-Maltose และจากการนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม API 50 CHL V 5.0 สามารถวินิจฉัยชนิดแบคทีเรียกรดแลคติก L14 L25 L26 และ L31 ได้เป็น *Pediococcus*

pentosaceus 1, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 และ *Pediococcus acidilactici* ตามลำดับ โดยให้ค่าร้อยละของความน่าจะเป็นเชื้อเหล่านี้เท่ากับ 99.6, 94.0, 96.5 และ 95.4 ตามลำดับ

4. ผลของ pH ต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก

บ่มเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก L14 L25 L26 และ L31 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง pH 2-11 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชม ปรากฏว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกตัวอย่างสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ pH 4-11 และมีผลทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอยู่ในช่วง pH 3-5 (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ pH 2-11 และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก

LAB ¹ pH ²	การเจริญ ของเชื้อ ³	pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังการเลี้ยงเชื้อ				
		Negative control	L14	L25	L26	L31
2	-	2.01	2.16	2.05	2.03	2.10
3	-	3.08	3.04	3.12	3.01	3.12
4	+	4.16	3.45	3.50	3.46	3.35
5	+	5.16	3.69	3.65	3.68	3.56
6	+	6.07	3.81	3.84	3.82	3.86
7	+	6.92	4.05	4.15	4.01	4.17
8	+	7.53	4.13	4.10	4.18	4.16
9	+	8.22	4.16	4.14	4.26	4.34
10	+	8.50	4.79	4.82	4.86	4.84
11	+	8.40	5.35	5.48	5.35	5.41

¹LAB, Lactic Acid Bacteria

²pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ก่อนปรับ pH เท่ากับ 6.33

³+, แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้; -, แบคทีเรียกรดแลคติกไม่สามารถเจริญได้

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

1. การเตรียมเชื้อ

โคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติก L14 L25 L26 และ L31 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก⁽¹⁰⁾ มีสีขาวขุ่น กลมมน ขอบเรียบ ขนาดโคโลนีประมาณ 2-3 มิลลิเมตร ติดสีย้อมแกรมบวก รูปร่างกลมถึงท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ ให้ผลลบกับการทดสอบเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียกรดแลคติก^(2, 9-11) โดยแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวสามารถผลิต เมตาบอไลต์ แบ่งออกได้เป็นสองชนิด คือ 1) ผลิตผลจากเซลล์ชนิดที่หนึ่ง (primary metabolite) ซึ่งผลิตในขณะที่มีการเจริญและเป็นสารที่ต้องการในการเจริญเติบโต ได้แก่ กรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ โปรตีน กรดนิวคลีอิก ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต 2) ผลิตผลจากเซลล์ชนิดที่สอง (secondary metabolites) ซึ่งผลิตหลังจากหยุดการเจริญและไม่เกิดกิจกรรมใดๆ อีกแล้ว เมตาบอไลต์ลำดับที่สองมีคุณสมบัติเป็นสารพิษหรือยาปฏิชีวนะที่อาจมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้โดยมีรายงานว่า เมตาบอไลต์จากแบคทีเรียกรดแลคติกมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือรา เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ รูเทอริน โดยเฉพาะแบคทีเรียโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกันหรือที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซินออกมา⁽¹²⁾ ซึ่งพบว่าฤทธิ์ยังค่อนข้างแคบ นอกจากนั้นฤทธิ์ต้านราซึ่งพบมีรายงานอยู่น้อย⁽¹³⁾ จึงได้นำแบคทีเรียกรดแลคติก L14 L25 L26 และ L31 มาทดสอบฤทธิ์ต้านราโดยวิธี double layer และวิธี agar well diffusion รวมไปถึงศึกษาความสามารถในการทนทานที่สภาวะ pH 2-11 ซึ่งได้มีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถเจริญได้ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก^(3,9,14) ซึ่งมีค่า pH อยู่ในช่วง 2-3 และมากกว่า 6 ตามลำดับ⁽¹⁵⁾

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านราของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกทุกตัวอย่าง (L14 L25 L26 และ L31) มีฤทธิ์ต้านราได้ทั้งยีสต์และราฝอยเมื่อนำมาศึกษาด้วยวิธี double layer ซึ่งอาจเป็นผลมา

จากเมตาบอไลต์ที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตออกมา โดยเฉพาะในกลุ่มของผลิตผลจากเซลล์ชนิดที่สอง^(6-7, 12) ดังกล่าวข้างต้น แต่ไม่สามารถยืนยันฤทธิ์ต้านราเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมาทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion ซึ่งอาจเนื่องมาจากความเข้มข้นและขนาดโมเลกุลของเมตาบอไลต์ หรือระยะเวลาที่บ่มเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก ตลอดจนความไม่เสถียรของสารที่ได้มาจากระบวนการเมตาบอไลต์^(3,14) ดังนั้นจึงอาจทำการทดสอบเพิ่มเติมด้วยวิธี broth dilution⁽¹⁶⁾ เพื่อหาระดับความเข้มข้นของเมตาบอไลต์ที่ต้านราหรือการทำให้เมตาบอไลต์มีความบริสุทธิ์และเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้น รวมไปถึงศึกษาถึงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่เหมาะสมเพื่อให้มีการผลิตผลิตผลจากเซลล์ชนิดที่สองออกมาในปริมาณมาก^(3-4, 6-7,17)

3. ผลของ pH ต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 ตัวอย่างสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มี pH 4-11 โดยทำให้มีค่า pH ลดลงจาก pH เริ่มต้น (pH 6.33) จึงอาจบอกได้ว่าเมตาบอไลต์ที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตออกมาเบื้องต้นคือกรด ซึ่งได้มีรายงานหลายฉบับพบว่ากรดแลคติก กรดอินทรีย์ และกรดอะซิติก มีผลในการยับยั้งการเจริญของราแต่ต้องมีการสกัดให้มีความบริสุทธิ์และเพิ่มความเข้มข้นของสารดังกล่าวจึงจะสามารถนำมาศึกษาฤทธิ์ได้^(3, 17) อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาศึกษาสามารถทนทานต่อ pH ในช่วงต่าง (pH 11) และ pH ค่อนไปทางกรด (pH 4) จึงเป็นที่น่าสนใจในการนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาใช้เป็น probiotic เพราะตรงตามนิยามของคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็น probiotic ได้คือต้องทนต่อสภาพแวดล้อมในลำไส้เล็กของ ทางเดินอาหาร ซึ่งในระบบดังกล่าวมีค่า pH อยู่ในช่วง 2-8⁽¹⁵⁾ และต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (GRAS = Generally Recommended As Safe) ต่อมนุษย์และสัตว์^(3-4, 11,14,18-20)

สรุป

แบคทีเรียกรดแลคติก L14 L25 L26 และ L31 สามารถวินิจฉัยชนิดได้เป็น *Pediococcus pentosaceus* 1, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis* ssp *lactis* 1 และ *Pediococcus acidilactici* ตามลำดับ เชื้อทั้งหมดมีฤทธิ์ต้านรา *Candida albicans*, *Aspergillus* spp. และ *Rhizopus* spp. เมื่อทดสอบด้วยวิธี double layer แต่ไม่แสดงฤทธิ์ดังกล่าวเมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion อาจเนื่องมาจากความไม่เสถียรของเมตาบอลิซึมที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตออกมา นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกตัวอย่างที่น่าสนใจมีความทนทานต่อ pH 4-11 ซึ่งอาจเป็นข้อดีในการนำมาใช้เป็น probiotic ได้ เพราะสามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นด่าง และค่อนข้างทนกรดซึ่งมีความสัมพันธ์กับกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กในร่างกายมนุษย์ที่มี pH อยู่ในช่วง 2-8⁽¹⁵⁾

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช และขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และสาธารณสุขศาสตร์ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และวัสดุอุปกรณ์บางอย่างในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. โคกิต ธีรราช. การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิดที่มีผลในการยับยั้งเชื้อรา. ภาควิชาพยาธิวิทยาสาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์). คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2542.
2. ดวงพร คันทโชติ. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์, 2537.
3. Batish VK, Roy U, Lal R, Grover S. Antifungal attributes of lactic acid bacteria A review. *Cri Rev Biotechnol* 1997; 17: 209-25.
4. ปาริชาติ พุ่มขจร, พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. แลคติกแอซิดแบคทีเรียและสารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์. *วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด* 2543; 12: 101-107.
5. เสาวนีย์ ธรรมสถิต. แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพเซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์. กรุงเทพมหานคร: สถาบันพัฒนาสาธารณสุขอาเซียน, 2547: 146-9.
6. Fazeli MR, Shahverdi AR, Sedaghat B, Jamalifar H, Samadi N. Sourdough-isolated *Lactobacillus fermentum* as a potent antimould preservative of a traditional Iranian bread. *Eur Food Res Technol* 2004; 218: 554-6.
7. Corsetti A, Gobebeiti M, Rossi J, Damiani P. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl Microbiol Biotechnol* 1998; 50: 253-6.
8. มณฑล เลิศคณาวนิชกุล. การแยกและคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตสารต้าน *Candida albicans*. *วารสารมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 2548; 2: 179-87.
9. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Volume 2. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986; 965-82.
10. Buckenhuskes HJ. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiol Rev* 1993; 12 : 253-71.
11. พงษ์เทพ วิไลพันธ์. แบคทีเรียโอซิน. *วารสารจารย์พา* 2546; 71: 16-25.
12. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriol Rev* 1976; 40: 722-56.
13. สุวณีย์ สุภเวชย์, มาลัย วรจิตร. แบคทีเรียพื้นฐาน. กรุงเทพมหานคร: ศิริยอด, 2540.
14. Carr FJ, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Crit Reva Microbiol* 2002; 28: 281-370.

15. O'May GA, Reynolds N, Smith AR, Kennedy A, Macfarlane GT. Effect of pH and antibiotics on microbial over growth in the stomachs and duodena of patients undergoing percutaneous endoscopic feeding. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3059-65.
16. มานิน จุลศิริ. ยาด้านจุลชีพ: ความรู้พื้นฐานและประยุกต์. กรุงเทพมหานคร: อักษรบัณฑิต, 2532.
17. Carolissen-Mackay V, Arendse G, Hastings JW. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *Int J Food Microbiol* 1997; 34: 1-16.
18. ธารรัตน์ ศุภศิริ. Probiotic; แบคทีเรียเพื่อสุขภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์* 2542;53:357-60.
19. อุทัย แก้วเอียน. โปรไบโอติกส์. *สงขลานครินทร์ เวชสาร* 2549; 24:315-20.
20. เอกชัย ชูเกียรติโรจน์. ศักยภาพของการใช้ probiotics. *วารสารสงขลานครินทร์ วทท.* 2546; 25: 275-82.