

ฤทธิ์ต้าน *Helicobacter pylori* และคุณสมบัติโพรบิโอดีทิกของสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัส

มาลัย ทวีโชติภัทร์ บุญรัตน์ ลัดดา ขวัญนันท์ นันทวิสัย ศรีสมบัติ พุฒิกมลกุล เครือวัลย์ โชติเลอศักดิ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทคัดย่อ

แลคโตบาซิลลัสมีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ ในการศึกษานี้ได้คัดแยกสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัสจากอุจจาระของทารกและอาหารหมักดอง เพื่อทดสอบคุณสมบัติในการต่อต้านการเจริญของเชื้อ *Helicobacter pylori* ทำการคัดแยกแลคโตบาซิลลัสได้ทั้งหมดจำนวน 400 สายพันธุ์ โดยอาศัยคุณสมบัติในการติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่งและไม่สร้างเอนไซม์อะมัยเลส จากนั้นทดสอบความสามารถในการต่อต้านเชื้อ *H. pylori* ด้วยวิธี agar spot พบว่า 100 สายพันธุ์ไม่ต่อต้านเชื้อ *H. pylori* มี 227 สายพันธุ์ต่อต้านได้ในระดับต่ำ และ 71 สายพันธุ์ต่อต้านได้ปานกลาง เป็นที่น่าสนใจว่ามี 2 สายพันธุ์ที่ต่อต้านเชื้อ *H. pylori* ได้สูง โดยทั้ง 2 สายพันธุ์มีคุณสมบัติโพรบิโอดีทิกคือ ทนต่อความเป็นกรดที่ pH 2.0, 3.0 และ 4.0 และทนต่อน้ำดีที่ความเข้มข้น 1-4% จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA gene พบว่าเป็น *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัสที่คัดแยกจากอุจจาระของทารกและแหล่งอาหารของคนไทย มีคุณสมบัติในการต่อต้านการเจริญของเชื้อก่อโรคชนิด *H. pylori* ซึ่งอาจจะนำไปเป็นโพรบิโอดีทิกที่เป็นประโยชน์ในการป้องกันและรักษาโรคติดเชื้อ *H. pylori* ได้ต่อไป

คำสำคัญ: แลคโตบาซิลลัส, *Helicobacter pylori*, โรคติดเชื้อ, โพรบิโอดีทิก

ผู้นิพนธ์ประสานงาน:

เครือวัลย์ โชติเลอศักดิ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

114 ถนนสุขุมวิท ซอยสุขุมวิท 23

แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา

กรุงเทพ 10110

อีเมล: kruawanc@g.swu.ac.th

Anti- *Helicobacter pylori* and probiotic activity of *Lactobacillus* Strains

Malai Taweechoatipatr, Boonyarut Ladda, Kwannan Nantavisai,

Srisombat Puttikamonkul, Kruawan Chotelersak

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

Abstract

Lactobacillus has beneficial effect to human health. In this study *Lactobacillus* were isolated from infant feces and fermented food to investigate for their inhibitory effect against *Helicobacter pylori* growth. A total of 400 *Lactobacillus* isolates were obtained. They were gram-positive, bacilli and catalase-negative. All isolates were tested for their anti-*H. pylori* activity by agar spot method. The results demonstrated that 100 isolates displayed no inhibitory activities, 227 isolates showed weak inhibitory activities and 71 isolates showed moderate inhibitory activities. Interestingly, 2 *Lactobacillus* isolates demonstrated strong inhibitory activities. They have probiotic activity including tolerance to pH 2.0, 3.0 and 4.0, and 1-4% bile salt condition. Base on 16S rRNA gene sequence analysis, The strains were identified as *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. This study demonstrated that *Lactobacillus* strains isolated from Thailand sources, such as infant feces and fermented food have anti-*H. pylori* activity, which may used as probiotics for prevention and treatment against *H. pylori* infection.

Keywords: *Lactobacillus*, *Helicobacter pylori*, infectious disease, probiotics

Corresponding Author:

Kruawan Chotelersak

Department of Microbiology, Faculty of Medicine,

Srinakharinwirot University

114 Sukhumvit Road, Sukhumvit 23,

Wattana, Bangkok 10110

Thailand

E-mail: kruawanc@g.swu.ac.th

บทนำ

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) โดยเฉพาะในสกุลแลคโตบาซิลลัสนั้น ได้มีการศึกษาเพื่อนำไปใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อต่างๆ เช่น ท้องเสีย (diarrhea) ลำไส้อักเสบเฉียบพลัน และลำไส้เน่าตายที่พบในทารก (necrotizing enterocolitis)¹ มีรายงานพบว่าแลคโตบาซิลลัสสามารถต่อต้านการเจริญของ *Helicobacter pylori*² และสามารถลดอาการของโรคกระเพาะอาหารอักเสบในหนูที่มีการติดเชื้อ *H. pylori* ได้³ นอกจากนี้ ยังสามารถลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาปฏิชีวนะในเด็กที่ติดเชื้อ *H. pylori* ได้อีกด้วย⁴

H. pylori เป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram negative) รูปร่างแท่ง มีแฟลกเจลลา (flagella) ที่ใช้ในการยึดเกาะและบุกรุกบริเวณชั้นในสุด (mucous layer) ของกระเพาะอาหาร จึงมักพบเชื้ออาศัยอยู่บริเวณเยื่อผิวชั้นในของกระเพาะอาหาร (luminal surface of the gastric epithelium) การติดแบคทีเรียชนิดนี้จะก่อให้เกิดโรคกระเพาะอาหารอักเสบ (gastritis)⁵ โดยเชื้อนี้สามารถเจริญได้ในกระเพาะอาหารที่มีสภาวะเป็นกรดเพราะเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ยูเรียส (urease enzyme) ได้โดยเปลี่ยนยูเรีย (urea) ที่อยู่ในน้ำย่อยของกระเพาะอาหาร (gastric juice) ให้เป็นแอมโมเนีย (ammonia) และคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide) ช่วยให้สภาวะกรดในกระเพาะอาหารลดลงเหมาะสมในการเจริญ การติดเชื้อระยะเวลานานหรือเรื้อรังจะทำให้เกิดการพัฒนาไปเป็นโรคแผลในกระเพาะอาหารหรือแผลในลำไส้เล็กส่วนต้น (gastric ulcer or duodenal ulcer) มะเร็งในกระเพาะอาหาร (gastric cancer) และมะเร็งต่อมน้ำเหลือง (gastric mucosa-associated lymphoid-tissue (MALT) lymphoma) ที่กระเพาะอาหาร พบว่าอุบัติการณ์ของการติดเชื้อ *H. pylori* ของประชากรโลกมีประมาณ 50% ขึ้นไปและกำลังเป็นปัญหาอยู่ทั่วโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศที่กำลัง

พัฒนาพบการติดเชื้อสูงถึง 70-90% ส่วนประเทศที่พัฒนาแล้วพบการติดเชื้อชนิดนี้น้อย⁵ การรักษาการติดเชื้อ *H. pylori* นั้นจะใช้วิธี triple therapy โดยการใช้ยา amoxicillin, clarithromycin และยายับยั้งการหลั่งโปรตอน (proton-pump inhibitor) แต่ยังมีปัญหาจากเชื้อดื้อต่อยา clarithromycin และ amoxicillin⁶ และผลข้างเคียงจากการใช้ยาปฏิชีวนะ

โพรไบโอติก (probiotics) เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อร่างกายได้รับเข้าไปในปริมาณที่เพียงพอ จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ ในปัจจุบัน โพรไบโอติกได้เข้ามามีบทบาทและนิยมแพร่หลายในทางการแพทย์โดยมีการนำมาใช้แทนหรือร่วมกับยาปฏิชีวนะ เนื่องจากมีความปลอดภัย ทนต่อสภาวะความเป็นกรดและน้ำดี และยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้⁷ โพรไบโอติกส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกโดยเฉพาะแลคโตบาซิลลัส การทำงานของโพรไบโอติกนั้นมีหลายกลไก เช่น ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค โดยอาจจะสร้างสารต่อต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial substances) หรืออาจจะเข้าไปแย่งพื้นที่ในการเจริญ (competitive exclusion) และปรับระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulation) เป็นต้น นอกจากนี้ ยังสามารถยึดเกาะเยื่อผิวในกระเพาะอาหารได้ ซึ่งจะทำให้โพรไบโอติกนั้นสามารถที่จะทำงานได้ดีแล้วอยู่รอดได้ในกระเพาะอาหาร⁸ แบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติเฉพาะของแต่ละสายพันธุ์ (strain dependent) ในบรรดาแบคทีเรียเหล่านั้นนั้น แลคโตบาซิลลัสเป็นชนิดที่มีการนำมาศึกษามากที่สุด เนื่องจากมีความปลอดภัย มีประวัติการใช้มายาวนาน แหล่งของโพรไบโอติกที่สำคัญสามารถแยกได้จากในคน สัตว์ และอาหารหมักดอง⁹⁻¹⁰

งานวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาคุณสมบัติในการต่อต้านการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ของแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดแลคโตบาซิลลัสที่คัดแยกจากอุจจาระของทารกและอาหารหมักดอง เพื่อให้

ได้สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นโพรไบโอติก และนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ในการป้องกัน และรักษาโรคติดเชื้อ *H. pylori* ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกแลคโตบาซิลลัสจากอุจจาระของทารกแรกคลอดและอาหารหมักดอง
2. เพื่อทดสอบคุณสมบัติการต่อต้านการเจริญของเชื้อ *Helicobacter pylori* ของแลคโตบาซิลลัส

วิธีการศึกษา

1. กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่าง คือ อุจจาระของทารกแรกคลอดจำนวน 300 ตัวอย่างจากโรงพยาบาลศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ และอาหารหมักดองชนิดต่างๆ เช่น แหนม ข้าวหมาก ต้นหอมดอง ผักกาดดอง จากอำเภอพนมไพร จังหวัดร้อยเอ็ด และกิมจิ จากเขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร จำนวน 14 ตัวอย่าง ในการเก็บตัวอย่างอุจจาระของทารกแรกคลอดนั้น มารดาเป็นผู้ให้ความยินยอมในแบบฟอร์มให้คำยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (Inform consent) ซึ่งได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมสำหรับพิจารณาโครงการวิจัยที่ทำในมนุษย์แล้ว (SWUEC 37/2551) ทำการเก็บตัวอย่างโดยใช้ sterile cotton swab ป้าย fresh fecal specimen นำไปใส่ใน Cary-Blair transport medium (Oxoid, Hampshire, England) และส่งทำการทดสอบโดยเร็วที่สุด

2. การคัดแยก รวบรวม เพาะเลี้ยง และการทดสอบลักษณะเบื้องต้นของสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัส

นำตัวอย่างอุจจาระทารกและอาหารหมักดองมาเจือจางและเพาะเลี้ยง เพื่อคัดแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ deMan-Rogosa-Sharpe (MRS) agar (Oxoid, Hampshire, England) บ่มที่อุณหภูมิ

37°C ใน Anaerobic jar (Mitsubishi, Japan) ที่มี Anaerobic GasPak (Mitsubishi Gas Chemical Co. Inc. Japan) เพื่อปรับให้อยู่ในสภาวะไร้อากาศ (0% O₂, 5% CO₂, 5% H₂, 90% N₂) เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ที่มีขนาดและลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน เช่น เล็ก กลาง ใหญ่ ขอบมัน ขอบใส สีขาว สีนม มาเพาะเลี้ยงต่อจนได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ ทำการศึกษาการติดสีโดยวิธีการย้อมแกรม และศึกษาสัณฐานวิทยาจากการติดสี ลักษณะรูปร่าง การเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) โดยป้ายเชื้อบนสไลด์แล้วหยด 3% H₂O₂ ลงบนเชื้อ ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้

3. การทดสอบความสามารถของสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัสในการต่อต้านเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี agar spot

ทำการทดสอบแลคโตบาซิลลัสที่แยกได้โดย spot แลคโตบาซิลลัสที่ต้องการทดสอบลงบน Brain heart infusion (BHI) agar (Oxoid, Hampshire, England) นำไปบ่มใน Anaerobic jar สภาวะไร้อากาศ ที่ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำจานอาหาร BHI agar ที่มีแลคโตบาซิลลัสเจริญอยู่แล้ว มาเททับผิวหน้าด้วย BHI soft agar ที่ผสม *H. pylori* H40 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 McFarland (10⁸ เซลล์/มล.) จากนั้นนำไปบ่มในสภาวะ microaerobic (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) ที่ 37°C เป็นเวลา 4-8 วัน แล้วนำมาตรวจสอบการต่อต้านการเจริญของเชื้อโดยสังเกตบริเวณที่เกิดโซนใสรอบๆ spot ซึ่งหมายถึงแลคโตบาซิลลัสต่อต้านการเจริญของเชื้อ *H. pylori* H40 เรียกว่า inhibition zone อ่านผลเป็นบวก วัดขนาดของโซนเป็นมิลลิเมตร (มม.) คัดเลือกแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ที่สามารถต่อต้านเชื้อ *H. pylori* H40 ได้สูงสุดมาทำการทดสอบต่อไป

4. การทดสอบความสามารถของสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัสในการทนต่อความเป็นกรดและน้ำดี

นำแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ที่สามารถต่อต้านเชื้อ *H. pylori* H40 ที่คัดเลือกไว้ มาทดสอบความสามารถในการทนต่อความเป็นกรดโดยเฉพาะเลี้ยงแลคโตบาซิลลัสที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 McFarland ลงใน MRS broth ที่ปรับด้วย 1 N HCL ให้ได้ระดับความเป็นกรด (pH) ที่ pH 2.0, 3.0 และ 4.0 บ่มที่ 37°C ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางแบคทีเรียโดยใช้ Phosphate buffer saline (PBS) นำไป spread plate แล้วบ่มใน Anaerobic jar สภาวะไร้อากาศ ที่ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบแลคโตบาซิลลัสที่รอดชีวิต (viable count) โดยคำนวณเป็นค่า CFU/ml

ทำการทดสอบความสามารถของแลคโตบาซิลลัสในการทนต่อน้ำดีด้วยวิธีการเช่นเดียวกัน โดยใช้ MRS broth ที่มี 1-4% bovine bile (Sigma, USA) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. การศึกษาการสร้างกรดของสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัสโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHL

นำแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ที่สามารถต่อต้านเชื้อ *H. pylori* H40 ที่คัดเลือกไว้ มาทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต โดยนำแลคโตบาซิลลัสที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง บ่มที่ความเร็ว 2,000 x g 5 นาที นำตะกอนที่ได้ไปเจือจางด้วย API 50 CHL medium ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 McFarland standard จากนั้นเติมลงไปในชุดทดสอบ API 50 CHL ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาล 49 ชนิด ปิดทับผิวหน้าแต่ละหลุมทดสอบด้วย paraffin oil นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกผลโดยสังเกตการเปลี่ยนจากสีม่วงน้ำเงินเป็นเหลืองที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงถือเป็นค่าบวก แล้วนำไปวิเคราะห์ผลในฐานข้อมูล API 50 CHL (<https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Identify>)

6. การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S ribosomal RNA gene ของสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัส

นำแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ที่ต่อต้านเชื้อ *H. pylori* H40 ที่คัดเลือกไว้ มาวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA gene โดยทำการเพิ่มปริมาณ 16S rRNA gene ด้วยเทคนิค colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 20F (5'-AGTTTGATCCTGGCTC-3') และ 1500R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') ทำการเพาะเลี้ยงแลคโตบาซิลลัสที่อุณหภูมิ 37 และ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคลนนี้เดี่ยวๆ มาละลายในน้ำกลั่นปริมาณ 30 µl เพื่อใช้เป็น DNA template เตรียม PCR mixture ประกอบด้วย 10X Taq Buffer, dNTP 10 mM, forward primer : 20F (10 pmol/µl), reverse primer : 1500R (10 pmol/µl), 25 mM MgCl₂, Taq DNA polymerase 5 Unit/ul, dH₂O และ DNA template ผสม PCR mixture ให้เข้ากันดีด้วยการ spin down แล้วนำเข้าเครื่อง PCR โดยเริ่มปฏิกิริยา pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 3 นาที ซึ่ง PCR cycle กำหนด 30 รอบ ประกอบด้วย denaturation 94°C เป็นเวลา 1 นาที, annealing 50°C เป็นเวลา 1 นาที, และ elongation 72°C เป็นเวลา 2 นาที และ final elongation 72°C เป็นเวลา 3 นาที ตรวจสอบ PCR product ด้วย agarose gel electrophoresis และนำ PCR product ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Geneaid Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech, Bade City, Taiwan) จากนั้นส่งวิเคราะห์หาลำดับเบสที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี ตรวจสอบและแก้ไขความถูกต้องของลำดับเบสที่ได้ ด้วยโปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Ribosomal Database Project (RDP II ; <http://rdp.cme.msu.edu/html>) เพื่อจำแนกชนิดโดยใช้เกณฑ์ในการจำแนกชนิดของแลคโตบาซิลลัสจากเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% similarity) ที่มีค่าคะแนนมากที่สุด และ ≥98%

ผลการศึกษา

การคัดแยก รวบรวม เพาะเลี้ยง และการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของแลคโตบาซิลลัส

จากการทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงได้จากอุจจาระของทารกแรกคลอดและอาหารหมักดอง โดยการย้อมสีแกรมและทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติของแลคโตบาซิลลัสได้ทั้งหมด 400 สายพันธุ์ โดยแยกได้จากอุจจาระของทารกแรกคลอด 382 สายพันธุ์ (รหัส LB 1-1 ถึง LB 324-3) และจากอาหารหมักดองชนิดต่างๆ 18 สายพันธุ์ (รหัส F 1-1 ถึง F 14-1) ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้มีลักษณะโคโลนีต่างๆ กันคือ สีขาวหรือเหลือง ขนาดใหญ่และเล็ก ติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง (bacilli) และไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลส

ความสามารถของแลคโตบาซิลลัสในการต่อต้านเชื้อ *H. pylori* โดยวิธี agar spot

จากการทดสอบคุณสมบัติของแลคโตบาซิลลัสจำนวน 400 สายพันธุ์ ในการต่อต้านการเจริญของเชื้อ *H. pylori* H40 ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยใช้วิธี agar spot พบว่าบริเวณที่เชื้อ *H. pylori* ถูกต่อต้านจะเกิดโซนใส (clear zone) อยู่รอบ spot ของแลคโตบาซิลลัส ซึ่งสามารถแยกกลุ่มของแลคโตบาซิลลัสตามคุณสมบัตินี้

ได้เป็น 4 กลุ่มคือ สายพันธุ์ของแลคโตบาซิลลัสที่ไม่ต่อต้านเชื้อ *H. pylori* H40 จำนวน 100 สายพันธุ์ สายพันธุ์ที่ต่อต้านเชื้อ *H. pylori* H40 ได้ในระดับต่ำ (weak inhibitory activity) ซึ่งมีโซนใสของการต่อต้านขนาด 5-7 มม. จำนวน 227 สายพันธุ์ สายพันธุ์ที่ต่อต้านเชื้อ *H. pylori* H40 ได้ปานกลาง (moderate inhibitory activity) มีโซนใสของการต่อต้านขนาด 8-9 มม. จำนวน 71 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่ต่อต้านเชื้อ *H. pylori* H40 ได้สูง (strong inhibitory activity) มีโซนใสของการต่อต้านขนาด 10-11 มม. จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ LB 1-2 และ LB 10-1 (ตารางที่ 1) ซึ่ง 2 สายพันธุ์นี้เป็นแลคโตบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากอุจจาระของทารกแรกคลอด และถูกคัดเลือกไว้ทำการทดสอบคุณสมบัติในขั้นตอนต่อไป

จากการวิเคราะห์ข้อมูลการต่อต้านการเจริญของเชื้อ *H. pylori* H40 ของแลคโตบาซิลลัสที่ทำการคัดแยกได้ โดยใช้สถิติ One-way ANOVA จากโปรแกรม GraphPad Prism version 5.0 ในการแปลผล พบว่าแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ LB 1-2 และ LB 10-1 สามารถต่อต้านการเจริญของเชื้อ *H. pylori* H40 ได้ดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ *Pseudomonas* sp. *Escherichia coli* และแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ LB 2-1 ซึ่งไม่ต่อต้านการเจริญของเชื้อ *H. pylori* H40 เป็นกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 1 แสดงผลการต่อต้านการเจริญของเชื้อ *Helicobacter pylori* ของสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัสที่คัดแยกได้

ขนาดของโซนใส (มม.)	จำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ (แบ่งตามแหล่งที่มา)	
	อุจจาระทารกแรกเกิด	อาหารหมักดอง
ไม่มีผล*	100	3
5-7	214	13
8-9	69	2
10-11	2	-
รวม	382	18

*ขนาดของ well = 4 มม.

ความสามารถของแลคโตบาซิลลัสในการทนต่อความเป็นกรดและน้ำดี

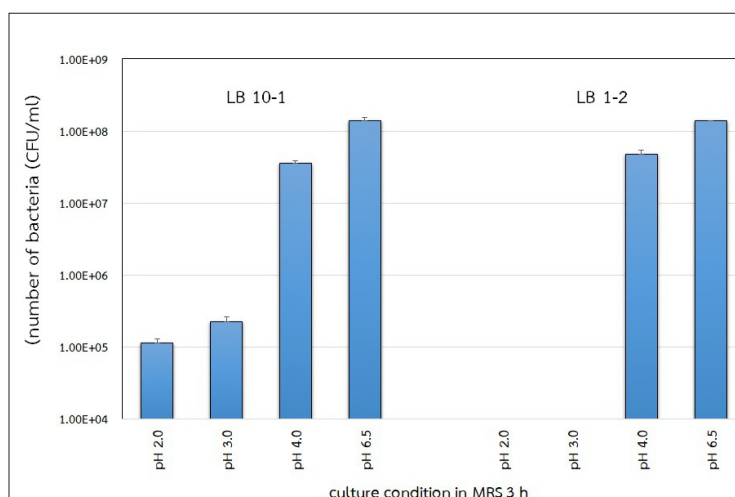
จากการนำแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ LB 1-2 และ LB 10-1 มาทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติกด้านความสามารถในการทนต่อกรดพบว่า หลังจากการบ่มที่สภาวะเป็นกรดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ LB 1-2 มีปริมาณเชื้อที่ยังคงมีชีวิตรอดอยู่ได้ ที่ pH 2.0, 3.0 และ 4.0 เท่ากับ 0%, 0% และ 34.5% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ LB 10-1 มีปริมาณเชื้อที่ยังคงมีชีวิตรอดอยู่ได้ ที่ pH 2.0, 3.0 และ 4.0 เท่ากับ 0.08%, 0.16% และ 25.6% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 2 และรูปที่ 1)

ส่วนการทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติกของแลคโตบาซิลลัสด้านความสามารถในการทนต่อน้ำดีพบว่า หลังจากการบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำดี 1, 2, 3 และ 4% แลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ LB 1-2 มีปริมาณเชื้อที่ยังคงมีชีวิตรอดอยู่ได้ในทั้ง 4 ความเข้มข้นของน้ำดีเท่ากับ 100% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ LB 10-1 มีปริมาณเชื้อที่ยังคงมีชีวิตรอดอยู่ได้ เท่ากับ 93%, 100%, 100% และ 100% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 3 และรูปที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงความสามารถในการทนต่อกรดของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ LB 10-1 และ LB 1-2

สภาวะการเพาะเลี้ยง		จำนวนแบคทีเรีย (เซลล์/มล.)	
อาหารเลี้ยงเชื้อ / เวลา	ค่า pH	LB 10-1	LB 1-2
MRS 3 hr	6.5	1.38E+08	1.38E+08
MRS 3 hr	2.0	1.15E+05	0.00E+00
MRS 3 hr	3.0	2.25E+05	0.00E+00
MRS 3 hr	4.0	3.54E+07	4.76E+07

*ปริมาณเชื้อเริ่มต้น = 2.02E+07 เซลล์/มล.

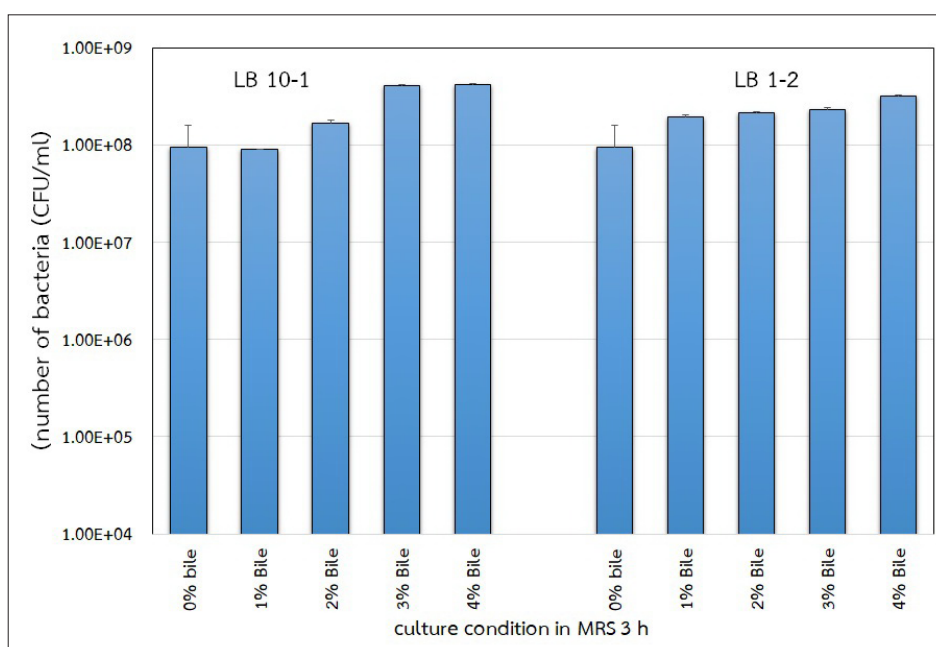


รูปที่ 1 แสดงความสามารถในการทนต่อกรดของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ LB 10-1 และ LB 1-2

ตารางที่ 3 แสดงความสามารถในการทนต่อกรดของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ LB 10-1 และ LB 1-2

สภาวะการเพาะเลี้ยง		จำนวนแบคทีเรีย (เซลล์/มล.)	
อาหารเลี้ยงเชื้อ / เวลา	% ของน้ำดี	LB 10-1	LB 1-2
MRS 3 hr	0%	1.06E+08	1.06E+08
MRS 3 hr	1%	8.90E+07	1.93E+08
MRS 3 hr	2%	1.65E+08	2.15E+08
MRS 3 hr	3%	4.05E+08	2.30E+08
MRS 3 hr	4%	4.20E+08	3.18E+08

*ปริมาณเชื้อเริ่มต้น = 5.15E+07 เซลล์/มล.



รูปที่ 2 แสดงความสามารถในการทนต่อกรดของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ LB 10-1 และ LB 1-2

การสร้างกรดของแลคโตบาซิลลัสโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHL

จากการทดสอบความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตใน API 50 CHL medium ของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ LB 1-2 และ LB 10-1 พบว่า

ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถสร้างกรดได้ ดังแสดงในตารางที่ 4 เมื่อนำไปวิเคราะห์ผลในฐานข้อมูล API 50 CHL พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์มีคุณสมบัติเหมือน (similarity) กับ *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* 92% และ 95% ตามลำดับ

ตารางที่ 4 แสดงความสามารถในการสร้างกรดของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ LB 1-2 และ LB 10-1 โดยใช้ API 50 CHL

ลำดับ	คาร์โบไฮเดรต	สายพันธุ์		ลำดับ	คาร์โบไฮเดรต	สายพันธุ์	
		LB 1-2	LB 10-1			LB 1-2	LB 10-1
1	Glycerol	+	+	26	Salicin	+	+
2	Erythritol	-	-	27	Cellobiose	+	+
3	D-arabinose	-	-	28	Maltose	+	+
4	L-arabinose	-	-	29	Lactose	-	-
5	Ribose	+	+	31	Sucrose	+	+
6	D-Xylose	-	-	32	Trehalose	+	+
7	L-Xylose	-	-	33	Inuline	-	-
8	Adonitol	-	-	34	Melezitose	+	+
9	β - methyl-D-xyloside	-	-	35	Raffinose	-	-
10	Galactose	+	+	36	Starch	-	-
11	Glucose	+	+	37	Glycogen	-	-
12	Fructose	+	+	38	Xylitol	-	-
13	Mannose	+	+	39	Gentiobiose	+	+
14	Sorbose	-	-	40	D-turanose	-	-
16	Dulcitol	-	-	41	D-lyxose	-	-
17	Inositol	-	-	42	D-tagatose	+	+
18	Mannitol	+	+	43	D-fucose	-	-
19	Sorbital	+	+	44	L-fucose	-	-
20	Methyl-D-mannoside	-	-	45	D-arabitol	-	-
21	Methyl-D-glucoside	-	-	46	L-arabitol	-	-
22	N-acethyl-glucosamine	+	+	47	Gluconate	+	+
23	Amygdalin	+	+	48	2-keto-gluconate	-	-
24	Arbutin	+	+	49	5-keto-gluconate	-	-
25	Esculin	+	+				

+ = acid production; - = no acid production

การพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA gene ของสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัสจากการนำแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ LB 1-2 และ LB 10-1 มาวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA gene พบว่าทั้งสองสายพันธุ์เป็น *Lactobacillus paracasei* โดยมีค่าความเหมือน (% Similarity) เท่ากับ 98.7% และ 99% ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงค่าความเหมือนของลำดับเบสของ 16S rRNA gene ของสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัส

แลคโตบาซิลลัส ที่คัดแยกได้	สายพันธุ์ที่มีค่าใกล้เคียงมากที่สุด	ค่าความเหมือนของลำดับเบส	
		% Similarity	ขนาด (bp)
LB 1-2	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> D79212 ^T	98.7	1414
LB 10-1	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> D79212 ^T	99	1435

อภิปรายผล

แลคโตบาซิลลัสที่แยกได้จากคนซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นที่ไม่ก่อโรคและจากอาหารหมักดองนั้น มีความปลอดภัยและมีประวัติการนำมาใช้เป็นอาหารเป็นระยะเวลาอันยาวนาน¹¹ มีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียหลายชนิดในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก รวมทั้งแลคโตบาซิลลัสที่แยกได้จากอุจจาระของทารก ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. brevis*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *Bifidobacterium infantis*, *B. breve*, *B. bifidum*¹² และแลคโตบาซิลลัสที่แยกได้จากอาหารหมักดอง ได้แก่ *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. sakei* และ *L. curvatus*¹³ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ จากการวิจัยนี้แลคโตบาซิลลัสที่แยกได้จากคนและอาหารหมักดอง มีความสามารถในการต่อต้านการเจริญของเชื้อ *H. pylori* ที่แตกต่างกัน โดยสายพันธุ์ที่แยกได้จากอุจจาระทารกแรกเกิดมีความสามารถในการยับยั้ง *H. pylori* ได้ดีกว่าสายพันธุ์ที่แยกได้จากอาหารหมักดอง เห็นได้จากผลการทดลองที่พบว่า สายพันธุ์ที่สามารถต่อต้านเชื้อ *H. pylori* ได้ดี จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ LB 1-2 และ LB 10-1 นั้น คัดแยกได้จากอุจจาระของทารกแรกเกิด ส่วนสายพันธุ์ที่แยกได้จากอาหารหมักดองส่วนใหญ่จะสามารถยับยั้ง *H. pylori* ได้ปานกลาง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา ที่พบว่าแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกับแบคทีเรียกรดแลคติกชนิด *E. faecium* ที่แยกได้จากอุจจาระของทารกสามารถต่อต้านการเจริญและต่อต้าน urease activity ของเชื้อ *H. pylori* ในหลอดทดลองได้¹⁴ นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า เมื่อรับประทานโยเกิร์ตที่มีแลคโตบาซิลลัสชนิด *L. gasseri* สามารถยับยั้งการติดเชื้อ *H. pylori* ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยทำให้ *H.*

pylori เปลี่ยนรูปร่างจากรูปแท่ง (rod shape) ไปเป็นรูปร่างกลม (coccoid shape) และไม่สามารถเจริญเติบโตได้อีกต่อไป¹⁵ และยังมีรายงานพบว่าแลคโตบาซิลลัสสามารถยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* ssp. *enterica*, *Shigella sonnei* และ *Clostridium difficile* ที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้¹⁶

จากงานวิจัยนี้พบว่าแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ LB 10-1 สามารถทนต่อกรดและน้ำดี สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่า สายพันธุ์ต่างๆ ของแลคโตบาซิลลัสนั้นสามารถทนต่อสภาวะกรดและน้ำดีได้ดี¹⁷⁻²⁰ ส่วนแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ LB 1-2 นั้น แม้ว่าจะสามารถทนต่อน้ำดี แต่ไม่สามารถทนต่อความเป็นกรดได้ที่ pH 2-3 ซึ่งเป็นช่วงของค่าความเป็นกรดในกระเพาะอาหารที่เชื้อโพรไบโอติกควรจะมีชีวิตอยู่รอดได้ จึงขาดคุณสมบัติโพรไบโอติกบางประการ แต่อย่างไรก็ตามหากทำการศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกอื่นๆ เพิ่มเติม ก็จะช่วยให้มีข้อมูลประกอบเพิ่มขึ้นสำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์ที่จะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป แลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ที่แยกได้จากอุจจาระทารกแรกเกิดนั้น เป็นเชื้อประจำถิ่นที่สามารถเจริญเติบโตได้ภายในระบบอาหารของมนุษย์ จึงสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีกรดและน้ำดี คุณสมบัติสำคัญของแลคโตบาซิลลัสที่สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดและน้ำดี ซึ่งเป็นคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกที่ดีนี้จะช่วยให้แลคโตบาซิลลัสสามารถเจริญได้ในทางเดินอาหาร²¹ ทำให้เชื้อออกฤทธิ์หรือสร้างสารต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายได้ ดังนั้น จากการวิจัยนี้จะเห็นได้ว่า ถ้าต้องการแยกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *H. pylori* ได้ดีควรที่จะทำการแยกจากอุจจาระเด็กดีกว่าแยกจากอาหารหมักดอง

จากการศึกษาการสร้างกรดของแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ LB 10-1 และ LB 1-2 นำไปวิเคราะห์ผลในฐานข้อมูล API 50 CHL พบว่าทั้ง

สองสายพันธุ์เป็น *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* เมื่อนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA gene และเปรียบเทียบลำดับเบสในฐานข้อมูล Ribosomal Database Project (RDP) พบว่าทั้งสองสายพันธุ์เป็น *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการบริโภคโพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. fermentum*, *L. paracasei*, *Bifidobacterium longum* ร่วมกับพรีไบโอติก (prebiotic) สามารถต่อต้านปฏิกิริยา oxidative activity ของเชื้อ *H. pylori* ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *H. pylori* ได้²²

การศึกษครั้งนี้ เป็นการคัดกรองคุณสมบัติโพรไบโอติกของแลคโตบาซิลลัสในเบื้องต้น ทำให้ได้เชื้อแลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ใหม่ในห้องแล็บ จากการศึกษที่ผ่านมาพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากนมจีนของไทยมีความสามารถต่อต้านเชื้อ *H. pylori* ได้ดี²³ จึงน่าสนใจว่าสายพันธุ์แลคโตบาซิลลัสที่แยกได้จากอาหารหมักดองที่ได้จากการทดลองนี้ เป็นสายพันธุ์ที่ควรนำมาศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกอื่นๆ เพิ่มเติมต่อไป

แลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ที่แยกได้จากอุจจาระของทารกและอาหารหมักดองนั้น นับว่าเป็นแหล่งของโพรไบโอติกที่สำคัญ เหมาะสำหรับการศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกอีกหลายด้าน ทั้งนี้แลคโตบาซิลลัสแต่ละชนิดมีคุณสมบัติเฉพาะแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ (strain specific) เนื่องจากสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดี จะมีสารบางอย่างที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compounds) ซึ่งน่าจะศึกษาต่อไป ไม่ว่าจะเป็นในด้านของการสร้างสารชีวภาพ กลไกการยับยั้งเชื้อก่อโรค ตลอดจนคุณสมบัติในการยึดเกาะและดำรงอยู่ในสภาวะของระบบทางเดินอาหาร หากแลคโตบาซิลลัสมีคุณสมบัติต่างๆ เหล่านี้จะทำให้สามารถ

ออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยต้องมีการศึกษาทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง เพื่อให้เกิดประโยชน์ทางการแพทย์และเป็นแนวทางในการนำไปรักษาโรคติดเชื้อ *H. pylori* และโรคติดเชื้ออื่นๆ ในระบบทางเดินอาหารต่อไป

สรุปผล

การศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกของแลคโตบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากอุจจาระของทารกและอาหารหมักดอง ในการต่อต้านเชื้อ *Helicobacter pylori* พบว่า มี 2 สายพันธุ์ คือ LB 1-2 และ LB 10-1 สามารถต่อต้านเชื้อ *H. pylori* ได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการทดสอบคุณสมบัติโพรไบโอติกในด้านการทนต่อความเป็นกรดและน้ำดีพบว่า แลคโตบาซิลลัสสายพันธุ์ LB 10-1 สามารถทนต่อกรดและน้ำดี และสายพันธุ์ LB 1-2 สามารถทนต่อน้ำดีและทนต่อกรดที่ pH 4.0 จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rRNA gene พบว่าทั้งสองสายพันธุ์มีความเหมือนกับ *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเงินรายได้คณะแพทยศาสตร์และศูนย์การแพทย์สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

เอกสารอ้างอิง

1. Nomoto K. Prevention of infections by probiotics. J Biosci Bioeng 2005;100:583-92.
2. Ryan KA, Daly P, Li Y, et al. Strain-specific inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus salivarius* and other lactobacilli. J Antimicrob Chemother 2008;61:831-4.

3. Cui Y, Wang CL, Liu XW, et al. Two stomach-originated *Lactobacillus* strains improve *Helicobacter pylori* infected murine gastritis. *World J Gastroenterol* 2010;16:445-52.
4. Lionetti E, Miniello VL, Castellaneta SP, et al. *Lactobacillus reuteri* therapy to reduce side-effects during anti-*Helicobacter pylori* treatment in children: a randomized placebo controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24:1461-8.
5. Kenneth EL. *Helicobacter pylori* Infection. *N Engl J Med* 2010;362:1597-604.
6. Megraud F. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, advances in testing. *Gut* 2004;53:1374-84.
7. FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food, Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. 2002 April 30-May 1, London, Ontario, Canada; 2002. p. 1-11.
8. Nikolaitchouk N, Wachter C, Falsen E, et al. *Lactobacillus coleohominis* sp. nov., isolated from human sources. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001;51:2081-5.
9. Roos S, Karner F, Axelsson L, et al. *Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with in vitro mucus-binding activity isolated from pig intestine. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:251-8.
10. Parvez S, Malik KA, Ah Kang S, et al. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol* 2006;100:1171-85.
11. Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* 2010;1:164-85.
12. Gu RX, Yang ZQ, Li ZH, et al. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China. *Anaerobe* 2008;14:313-7.
13. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Genes and molecules of Lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008;72:728-64.
14. Tsai CC, Huang LF, Lin CC, et al. Antagonistic activity against *Helicobacter pylori* infection in vitro by a strain of *Enterococcus faecium* TM39. *Int J Food Microbiol* 2004;96:1-12.
15. Fujimura S, Watanabe A, Kimura K, et al. Probiotic mechanism of *Lactobacillus gasseri* OLL2716 strain against *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2012;50:1134-6.
16. Hutt P, Shchepetova J, Loivukene K, et al. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *J Appl Microbiol* 2006;10:1324-32.

17. Boonkumklao P, Kongthong P, Assavanig A. Acid and Bile Tolerance of *Lactobacillus thermotolerans*, a Novel Species Isolated from Chicken Feces. Kasetsart J Nat Sci 2006;40:13-17.
18. Morelli L. In vitro selection of probiotic lactobacilli: A critical appraisal. Cur. Issues Intest Microbiol 2000;1:59-67.
19. Pan X, Chen F, Wua T, et al. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. Food Control 2009;20:598-602.
20. Sieladie DV, Zambou NF, Kaktcham PM, et al. Probiotic properties of lactobacilli strains isolated from raw cow milk in the western highlands of cameroon. Innovat Rom Food Biotechno. 2011;9:12-28.
21. Mirlohi M, Soleimani-Zad S, Dokhani S, et al. Investigation of acid and bile tolerance of native lactobacilli isolated from fecal samples and commercial probiotics by growth and survival studies. Iran J Biotechnol 2009;7:233-40.
22. Hutt P, Andreson H, Kullisaar T, et al. Effects of a synbiotic product on blood antioxidative activity in subjects colonized with *Helicobacter pylori*. Lett Appl Microbiol 2009;48(6):797-800.
23. Techo S, Visessanguan W, Vilaichone R, et al. Characterization and Antibacterial Activity Against *Helicobacter pylori* of Lactic Acid Bacteria Isolated from Thai Fermented Rice Noodle. Probiotics & Antimicro. Prot 2018. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9385-z>.