รายงานวิจัย

ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในผัก ผลไม้ดองท้องถิ่น เพื่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

Amount and isolates of lactic acid bacteria in pickled local vegetables and fruits for inhibition pathogenic bacteria

โดย

นุรอัยนี หะยียูโซะ

คอสียาห์ สะลี

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี

ซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ

พูรกอนนี สาและ

ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณบำรุงการศึกษา ประจำปี 2559

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

หัวข้อวิจัย ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในผัก ผลไม้ดองท้องถิ่นเพื่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

ชื่อผู้วิจัย นุรอัยนี หะยียูโซะ คอสียาห์ สะลี อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี ซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ และพูรกอนนี สาและ

คณะ/หน่วยงาน วิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร

มหาวิทยาลัย ราชภัฏยะลา

ปีงบประมาณ 2559

บทคัดย่อ

อาหารหมักดองได้รับความสนใจในปัจจุบันเนื่องจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองนี้พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่ศึกษาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในผัก ผลไม้ดองท้องถิ่น และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค (*S. aureus Bacillus* sp. และ *E. coli*) ทำการทดลองจากตัวอย่างผักและผลไม้ดองในท้องถิ่น 6 ชนิด ได้แก่ ลูกเนียงดอง ผักเสี้ยนดอง ขมิ้นขาวดอง ตะลิงปลิงดอง ลูกตะขบดองและกระท้อนดอง จากตลาดนัด อำเภอยะรัง จังหวัดปัตตานี และตลาดสด อำเภอเมือง จังหวัดยะลา และนำมาเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS agar ที่ผสม Bromocresol purple 0.004% พบว่าจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดอยู่ระหว่าง 0.9 - 7×10^{2} CFU/g เมื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจนได้เชื้อบริสุทธิ์ พบว่าสามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 19 ไอโซเลต หลังจากนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้งหมดมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งด้วยวิธีการ Agar well diffusion ผลปรากฏว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* มีทั้งหมด 4 ไอโซเลต ได้แก่ S2, TA1, TA2, TA3, และแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มีทั้งหมด 9 ไอโซเลต ได้แก่ S1, S2, TA1, TA2, TA3 N4, N5, T และ P2 ส่วนเชื้อ *Bacillus* sp. ไม่มีไอโซเลตใดสามารถยับยั้งได้เลย เมื่อเปรียบเทียบขนาดวงของวงใสพบว่า S1 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้มากที่สุด (20.87±0.2 มม.) คิดค่าเปอร์เซ็นต์ของอัตราส่วนของการยับยั้ง (%IR) มีค่าเท่ากับ 85.23% รองลงมาคือ N5 (20.10 ±1.1 มม.) %IR มีค่าเท่ากับ 81.46% และอันดับที่สามคือ T (16.89 ±2.1 มม.) %IR มีค่าเท่ากับ 65.49% เมื่อนำมาทดสอบทางชีวเคมีบางประการ พบว่า ไอโซเลต S1 และ N5 มีแนวโน้มอยู่ในจีนัส *Lactobacillus* ไอโซเลต T มีแนวโน้มอยู่ในจีนัส *Lactococcus* เมื่อทดสอบการยับยั้งต่ำสุดด้วยวิธี Spot-on-lawn method พบว่า S1 ซึ่งแยกจากผักเสี้ยนดองสามารถยับยั้ง *S. aureus* ต่ำสุดเท่ากับ 200 U/ml ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปต่อยอดในการศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกและการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์เพื่อยกระดับการผลิตอาหารหมักพื้นบ้าน

Research Title Amount and isolates of lactic acid bacteria in pickled local vegetables and fruits for inhibition pathogenic bacteria

Researcher Nur-ainee Hayeeyusoh Khosiya Sali Abdullah Dolah Dalee Zubaidah Hajiwangoh and Phurkonni Saleah

Faculty/Section Science Technology and Agricultural

University Yala Rajabhat

Year 2016

ABSTRACT

Currently interested in the fermented food product are found to contain bacteria, lactic acid bacteria that have been accepted as safe. Therefore, this researcher was interested in the amount and type of lactic acid bacteria in Local vegetables and fruits pickled. Performance tests and inhibition pathogenic bacteria (*S. aureus*, *Bacillus* sp. and *E. coli*) by testing samples of local fruits and vegetables pickled in six samples. Including Look-Niang pickled, tare pickled, white turmeric pickled, Ta-ling Pling pickled, Takhop pickled and Santol pickled from Market Yarang, Pattani and market the city of Yala.. Cultivation of lactic acid bacteria was cultivate on MRS agar + bromocresol purple 0.004%. The results showed that amount of lactic acid bacteria are between 0.9-7 × 10^2 CFU/g, isolated as a pure culture. The collection of 19 isolations were test inhibited by Agar well diffusion method, the results showed that inhibition of *E. coli* isolations, including S2, TA1, TA2, and TA3. Bacteria's inhibition of isolated *S. aureus* , including S1, S2, TA1, TA2, TA3 N4, N5, T and P2. *Bacillus* sp. isolated without any inhibition at all. Comparing the size of the clear zone was found S1 inhibition of *S. aureus*; as the most (20.87 ± 0.2 mm). The percentage of Inhibition Ratio; %IR is equal to 85.23%, followed by the N5 (20.10 ± 1.1 mm). %IR is equal to 81.46%, and the third was T (16.89 ± 2.1 mm.) % IR is equal to 65.49%. Biochemical tests showed that some isolated S1 and N5 were likely in the genus *Lactobacillus*, but T isolation was likely in the genus *Lactococcus*. The tests with minimum inhibitory with spot-on-lawn method that S1, which can inhibit *S. aureus* isolated from tare pickled minimum of 200 U/ml. The data which is obtained can be reproduced features probiotic starter culture and purification in order to raise local food.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ได้ โดยได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณบำรุงการศึกษาประจำปี 2559 มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา และความช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่งจากเพื่อนอาจารย์ทุกท่านในสาขาจุลชีววิทยา ให้ความช่วยเหลือทุกครั้งที่เกิดปัญหา

ขอขอบคุณ ครอบครัว และทุกคนที่คอยให้กำลังใจและความช่วยเหลือเสมอมา จนทำให้วิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอบคุณทุกฝ่ายที่ไม่ได้กล่าวในที่นี้ด้วย

นุรอัยนี หะยียูโซะและคณะ

28 ตุลาคม 2559

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
YALA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 อาหารหมัก	3
2.2 แบคทีเรียกรดแลคติก	6
2.3 การจัดกลุ่มและจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติก	8
2.4 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติก	10
2.5 แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสำคัญในด้านโพรไบโอติก	16
2.6 แบคทีเรียก่อโรค	18
2.7 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลชีพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	22
2.8 รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	25
3.1 กลุ่มตัวอย่าง	25
3.2 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ	25
3.3 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการ	26
บทที่ 4 ผลการวิจัย	30
4.1 ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์และแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด	30
4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค	32
4.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับจีนัส	37
4.4 การทดสอบการยับยั้งต่ำสุด	38
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	40
5.1 สรุป และอภิปรายผล	40
5.2 ข้อเสนอแนะ	41

หน้า

บรรณานุกรม 42
ภาคผนวก 46
ก. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 47
ข. ภาพการทดลอง 51
ประวัติคณะผู้วิจัย 61

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

4.1 ปริมาณจุลินทรีย์และแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในผัก ผลไม้ดองท้องถิ่น 31

4.2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักและผลไม้ดองท้องถิ่น 32

4.3 ขนาดวงใสการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค โดยแบคทีเรียกรดแลคติก 33

4.4 การยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* โดยแบคทีเรียกรดแลคติก 37

4.5 แสดงลักษณะสำคัญของแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับจีนัส 38

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา YALA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 กระบวนการหมักแบบ Homofermentative และ Heteromofermentative 10
4.1 ไอโซเลต S1 คัดแยกจากผักเสี้ยนดอง 34
4.2 ไอโซเลต N5 คัดแยกจากลูกเนียงดอง 35
4.3 ไอโซเลต T คัดแยกจากกระท้อนดอง 36
4.4 การยับยั้งต่ำสุด S1 ต่อเชื้อ *S.aureus* จากผักเสี้ยนดอง 39

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา YALA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ผักและผลไม้ดองท้องถิ่น เป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่ได้สืบทอดความรู้ โดยนำวัตถุดิบที่มีอยู่ในท้องถิ่นทำการหมักหรือดองเพื่อเป็นการรักษาคุณภาพอาหารให้ยาวนาน และเป็นการถนอมอาหารก่อนที่ฤดูกาลผลผลิตจะผ่านไป ซึ่งส่วนใหญ่จะนิยมใช้ในครัวเรือน โดยไม่คำนึงถึงความปลอดภัยและการก่อโรคที่ส่งผลต่อร่างกายในอนาคต

ปัจจุบันผู้บริโภคได้เพิ่มความสนใจในการเลือกที่จะบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนส่งเสริมสุขภาพกันมากขึ้น เป็นผลิตภัณฑ์หนึ่งได้รับความสนใจอย่างมากคือผลิตภัณฑ์อาหารหมักแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งแบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (generally recognized as safe bacteria; GRAS status) เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการถนอมอาหาร โดยทำให้เกิดการปรับค่า pH ของวัตถุดิบ ซึ่งเป็นตัวแปรที่สำคัญในการรักษาผลิตภัณฑ์ ช่วยเปลี่ยนแปลงลักษณะรสชาติ เนื้อสัมผัส กลิ่น และคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์ยังมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ซึ่งมีประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์ ทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร และผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคเพื่อทำให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เป็นต้น (Hector et al., 2009)

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักในปัจจุบันได้มีการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากวัตถุดิบในท้องถิ่น อาทิเช่น ลูกเนียงดอง ขมิ้นขาวดอง ผักเสี้ยนดอง ลูกตะขบดอง ตะลิงปลิงดอง มะขามดอง มะกอกดอง สะตอดอง มะปรางดอง และอื่นๆอีกมากมาย ซึ่งผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ผลิตจากพืชผักเป็นอาหารที่มีประโยชน์เนื่องจากผักมีสารต้านอนุมูลอิสระ วิตามิน เส้นใยในอาหาร และแร่ธาตุสูง แต่สำหรับในทวีปเอเชียรวมทั้งประเทศไทยผลิตภัณฑ์ผักดองยังคงเป็นการหมักแบบธรรมชาติจากจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณผิวภายนอกของพืช โดยอาศัยการควบคุมสภาวะในการหมักให้เหมาะสมเพื่อจุลินทรีย์ที่ต้องการเจริญได้ดี ซึ่งเป็นวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาผักและผลไม้ และเป็นวิธีการง่าย (Wang et al., 2010) ในระดับอุตสาหกรรมมีการใช้แบคทีเรียเป็นหัวเชื้อตั้งต้นเพื่อเติมลงในอาหารจะมีผลกลิ่น รส และเนื้อสัมผัสของอาหาร นอกจากนี้กลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก อาทิ *Lactolacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp.ยังมีคุณสมบัติที่ทนต่อกรดและน้ำดี ทำให้สามารถมีชีวิตอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารอันเป็น

คุณสมบัติที่สำคัญของการเป็นโพรไบโอติก ซึ่งหมายถึงจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่โดยการคงสภาพสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ทำให้เกิดความต้านทานต่อจุลินทรีย์ในลำไส้ จึงมีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค

ดังนั้นงานวิจัยนี้มีความสนใจที่จะศึกษาการคัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารจากผักและผลไม้หมักดองท้องถิ่น ศึกษาการทดสอบปริมาณและประสิทธิภาพการยับยั้งต่ำสุด ยังเป็นแนวทางในการนำมาประยุกต์ใช้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดต่างๆที่มีประโยชน์ต่อผู้บริโภค

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกในผักและผลไม้ดองท้องถิ่น

1.2.2 เพื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

1.2.3 เพื่อระบุจีนัสแบคทีเรียกรดแลคติกจากผักและผักผลไม้ดองท้องถิ่น

1.2.4 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentration; MIC)

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 เก็บตัวอย่างผักและผลไม้ดองท้องถิ่น ได้แก่ ลูกเนียงดอง ขมิ้นขาวดอง ผักเสี้ยนดอง ลูกตะขบดอง ตะลิงปลิงดอง และกระท้อนดอง

1.3.2 ศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *Bacillus* sp.

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบแบคทีเรียกรดแลคติกในผักและผลไม้ดองท้องถิ่น

1.4.2 ทราบจีนัสแบคทีเรียกรดแลคติกจากผักและผักผลไม้ดองท้องถิ่นที่คัดแยกได้

1.4.3 ทราบประสิทธิภาพการยับยั้งต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentration MIC) ได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อาหารหมัก

อาหารหมัก (Fermented food) เป็นกระบวนหนึ่งที่ยอมรับว่าเป็นกรรมวิธีที่ใช้ในการถนอมอาหาร เป็นกระบวนการที่ทำให้สารประกอบของอาหารเปลี่ยนไป เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น เช่น อะไมเลส (amylase) ไลเปส (lipase) และโปรตีเอส (protease) โดยกระบวนการหมักอาหารทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางคุณลักษณะของวัตถุดิบ เช่น คุณค่าของอาหารเน่าเสีย รสชาติที่เป็นเอกลักษณ์ของอาหารหมัก เพิ่มกลิ่น เนื้อสัมผัส โปรตีน วิตามิน กรดอะมิโนจำเป็น สามารถรักษาอาหารได้นานขึ้น (Holzepfel, 2002) จุลินทรีย์ที่เป็นตัวหมักคือแบคทีเรียกรดแลคติกพบได้ทั้งในเนื้อสัตว์ ผักและผลไม้ แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มที่แบคทีเรียที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคสและทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในการหมัก

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองพื้นบ้านจัดเป็นศิลปะพื้นบ้านอย่างหนึ่งที่มีการถ่ายทอดต่อๆกันมา ต้องอาศัยเทคนิคและเคล็ดลับเพื่อให้ได้อาหารหมักดองที่มีลักษณะที่ต้องการ อาหารหมักดองเป็นอาหารหมักธรรมชาติอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อโรค แต่หากได้นำอาหารหมักดองพื้นบ้านที่เตรียมอย่างถูกหลักอนามัยย่อมทำให้อาหารหมักดองคุณภาพดีและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น ดั้งนั้นจึงมีการพัฒนาอาหารหมักท้องถิ่นเพื่อรักษาคุณภาพของอาหารให้นานขึ้น

2.1.1 ผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดอง (Fermented vegetable and fruits product)

ผักดองและผลไม้เป็นวิธีการถนอมอาหารที่ใช้กันมานานเพื่อชะลอการเน่าเสียของผักและผลไม้ เป็นการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้หลายเดือนโดยไม่ต้องอาศัยห้องเย็น ลงทุนน้อย ใช้เครื่องจักรน้อย และไม่ต้องอาศัยเทคโนโลยีชั้นสูงในการผลิต กระบวนการดองเริ่มขึ้นจากความต้องการของมนุษย์เพื่อยืดอายุการเก็บอาหารเพื่อใช้ในระหว่างฤดูกาลของผลผลิตนั้นๆ หรือเพื่อไว้บริโภคในระหว่างเดินทางไกล นอกจากเหตุผลยืดอายุแล้วการดองยังให้เกิดลักษณะเฉพาะในด้านกลิ่นรสที่เป็นที่ชื่นชอบของผู้บริโภค ปัจจุบันการบริโภคผักดองยังเป็นที่นิยมในประเทศสหรัฐอเมริกาผักดองที่มียอดจำหน่ายสูงสุดได้แก่ แตงกวาดอง หน่อไม้ดอง เป็นต้นการทำผักดอง เป็นการทำให้ผักสามารถเก็บไว้บริโภคได้นานขึ้น โดยการนำมาแปรรูป ซึ่งในการดองส่วนใหญ่เกิดการกิจกรรมของแบคทีเรียแลคติก ผักที่นิยมมาดองส่วนมากจะเป็นกะหล่ำปลีดอง หอม แตงกวา หน่อไม้ เป็นต้น ปัจจุบันการดองอุตสาหกรรมการค้าในประเทศไทยที่เป็นรู้จักของคนทั่วไป (Steinkraus, 1997)

2.1.2 วิธีการถนอมอาหารหมักดองตามความเข้มข้นของเกลือ แบ่งเป็น 2 กลุ่มดังนี้

2.1.2.1 การดองผักและผลไม้ โดยใช้เกลือปริมาณ 2.5-5% เพื่อให้แบคทีเรียแลคติกที่ติดมากับผลิตผลทางการเกษตรสร้างกรดแลคติกจนได้ความเข้มข้นของกรดแลคติก หลังกระบวนการหมักประมาณ 1% ผลิตภัณฑ์บริโภคทันที กรรมวิธีการดองสามารถทำได้โดยใช้น้ำเกลือ เช่น หน่อไม้ดอง ผักกาดดองเปรี้ยว หรือการดองด้วยเกลือแห้ง เช่น กะหล่ำปลีดอง และกิมจิ

2.1.2.2 การดองผักและผลไม้โดยใช้เกลือความเข้มข้น 6-12% ทำให้เกิดการหมักด้วยจุลินทรีย์ ผลิตภัณฑ์กลุ่มนี้เรียกว่า salt-stock pickles ก่อนนำมาแปรรูปผลิตภัณฑ์ต่างๆ ต้องนำผักผลไม้มาแช่น้ำหรือเปลี่ยนน้ำหลายๆครั้ง เพื่อชะล้างเกลือออกทำให้ความเค็มลดลง เช่น ผักกาดดอง มะกอกดอง แตงกวาดอง เป็นต้น

2.1.3 ขั้นตอนการหมักดองผักและผลไม้

2.1.3.1 ล้างภาชนะที่บรรจุอาหารให้สะอาด ลวกหรือต้มในน้ำเดือด 10-15 นาที แล้วผึ่งบนตะแกรงให้แห้ง

2.1.3.2 ปอกเปลือกผลไม้ หั่น ตัด หรือแต่งเป็นชิ้นตามที่ต้องการ

2.13.3 เตรียมส่วนผสมโดยอาจผสมเกลือกับน้ำ น้ำส้มสายชูกับน้ำเกลือ น้ำ และเครื่องเทศเข้าด้วยกันทำการต้มให้เข้ากันแล้วกรองทิ้งให้เย็น

2.1.3.4 ส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงภาชนะบรรจุอาหาร ทำการดอง 5-7 วัน รับประทาน

2.1.4 พืชในท้องถิ่นที่นำมาหมักดอง

2.1.4.1. ลูกเนียง เป็นไม้ต้นขนาดกลางสูง 10-15 เมตรเปลือกต้นสีเทาหรือน้ำตาลอ่อนปนเทาเรือนยอดเป็นพุ่มกลมใหญ่ดอกสีขาวขนาดเล็กออกเป็นช่อผลเป็นฝักแบนเป็นเกลียวไปทางเดียวกันคล้ายรูปเกือกม้าผิวสีน้ำตาลคล้ำหรือน้ำตาลอมม่วงเมล็ดมีลักษณะคล้ายเมล็ดถั่ว 2 ฝา ลูกเนียงนับเป็นผักที่มีคุณค่าทางอาหารคือแคลเซียมฟอสฟอรัสและเหล็กมีกรดอะมิโน 18 ชนิดเป็นต้น ลูกเนียงหรือเมล็ดเนียงเป็นผักที่นิยมรับประทานกันโดยเฉพาะทางภาคใต้ซึ่งนิยมรับประทานเป็นผักสด ใช้ลูกอ่อนปอกเปลือกจิ้มน้ำพริกหรือรับประทานร่วมกับอาหารรสเผ็ด

ประโยชน์ นิยมรับประทาน เช่น จิ้มน้ำพริก หรือ รับประทานร่วมกับอาหารรสเผ็ด ได้แก่ แกงส้ม แกงกะทิ และขนมจีน นอกจากนี้ ยังใช้เป็นอาหารหวานพวกขนม คือนำลูกเนียงมาต้มแล้วจิ้มมะพร้าวกิน นอก จากนี้ลูกเนียงยังมีสรรพคุณรักษาโรคเบาหวาน

2.1.4.2 ขมิ้นขาวหรือว่านม่วง เป็นพืชล้มลุกที่มีเหง้าใต้ดิน จัดอยู่ในสกุลเดียวกับขมิ้นชัน ขมิ้นขาวปลูกง่ายและไม่ค่อยมีโรคหรือแมลงศัตรูพืชรบกวน มีดอกออกเป็นช่อสวยงาม จึง

เป็นได้ทั้งพืชสวนครัวและไม้ประดับ ลำต้นขมิ้นขาวที่นิยมนำมากินกันก็คือ เหง้าอ่อน ซึ่งมีกลิ่นหอม เนื้อกรอบ รสเผ็ดร้อนและเจือขมเล็กน้อย รสจะเผ็ดกว่าข่า แต่ก็ไม่มากเท่าขิง

ประโยชน์ เหง้าสด นำมารับประทานเป็นผักสดร่วมกับน้ำพริก หรือนำไปยำแกง มีสรรพคุณช่วยย่อยอาหาร ขับลม และลดอาการจุกเสียดแน่นท้อง ขมิ้นขาวยังช่วยให้เจริญอาหาร ขับปัสสาวะ ลดอาการอักเสบรักษาแผลในกระเพาะ และช่วยขับน้ำนมสำหรับสตรีที่อยู่ในช่วงให้นมบุตร

2.1.4.3 ผักเสี้ยน เป็นไม้ล้มลุก เนื้ออ่อน สูงไม่เกิน 1 เมตร แตกกิ่งก้านเป็นพุ่มกว้าง ตามลำต้นและกิ่งก้าน มีต่อมขนอ่อนปกคลุม ดอกออกเป็นช่อปลายกิ่ง กลีบดอกขาว หรือเหลือบม่วง ดอกมีลักษณะเป็นเส้นยาวเล็กคล้ายเสี้ยน จึงเรียกชื่อว่า ผักเสี้ยนดองหมายถึงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำผักเสี้ยนที่สดและอยู่ในสภาพดีมาล้างให้สะอาดผึ่งให้สะเด็ดน้ำหั่นเป็นชิ้นยาวตามต้องการดองในน้ำเกลือหรือคลุกผสมกับเกลืออาจเติมส่วนผสมอื่นเช่น น้ำซาวข้าว ข้าวสุก หมักไว้ในระยะเวลาที่เหมาะสมอาจนำมาดองในน้ำปรุงรสอีกครั้ง

ประโยชน์นิยมรับประทานกับข้าวสวย ต้มจิ้มน้ำพริก และสามารถใช้ยารักษาโรค โดยใช้ใบ มีฤทธิ์ทำให้ผิวหนังร้อนแดง นำใบมาบดหรือตำใช้ทาแก้ปวดเมื่อยทำให้เลือดมาเลี้ยงตรงบริเวณนั้นเพิ่มขึ้น น้ำมันจะเป็นยาแก้ปวดหู ใบของผักเสี้ยนมีรสขม ช่วยขับเสมหะ มีฤทธิ์ขับพยาธิไส้เดือน เป็นต้น

ผักเสี้ยนดองสูตรภาคใต้ ผักเสี้ยนดอง ภาษามลายูเรียกว่า ‘ยือโฆ๊ะมาแม’ ในชุมชนมุสลิมนิยมกินเป็นผักเหนาะ วิธีรับประทานให้นำมาขยี้กับพริก ปลาย่าง แล้วคลุกในน้ำผักดองรับประทานเป็นกับข้าว คนเฒ่าคนแก่ชอบรับประทานกันมาก โดยเฉพาะเป็นอาหารในช่วงถือศีลอดและวันละศีลอด เพราะคนแก่มักจะกินเพื่อให้เจริญอาหาร

ส่วนประกอบ ผักเสี้ยน 2-3 กำมือ เกลือ 1 ช้อนโต๊ะ ข้าวสุก 2-3 ช้อนโต๊ะ หรือน้ำซาวข้าวพอท่วมผักเสี้ยน

วิธีทำ นำผักเสี้ยนที่โตเต็มที่แต่ยังไม่ออกดอก ตัดเอาเฉพาะยอด ล้างให้สะอาด นำไปผึ่งลมพอเฉา นำมาเคล้าเกลือให้ทั่ว ตามด้วยข้าวสุกเคล้าให้เข้ากัน ใส่ในภาชนะแก้วหรือภาชนะเคลือบที่มีฝาปิด ใส่น้ำหรือน้ำซาวข้าวพอท่วม ปิดฝา เก็บไว้ 2-3 วันก็สามารถนำมารับประทานได้ (คม ชัด ลึก, 2556)

2.1.4.4. กระท้อน เป็นไม้ผลเขตร้อนเป็นไม้ยืนต้น ขึ้นตามป่าดิบชื้น บนพื้นที่ราบต่ำและพบขึ้นห่างๆ ตามหุบเขาจนถึงที่สูงระดับน้ำทะเลประมาณ 800 เมตร เป็นพืชไม้ที่สูงประมาณ 15-30 เมตร อายุขัยเฉลี่ยประมาณ 40-50 ปี เปลือกต้นสีเทา ใบประกอบมีใบย่อย 3 ใบ การเกาะติดของใบบนกิ่งแบบเรียงสลับ มีขนาดกว้าง 6-15 เซนติเมตร ยาว 8-20 เซนติเมตร

ประโยชน์ทางอาหาร ใช้แกง ดอง ทำกระท้อนแช่อิ่ม ทำกระท้องทรงเครื่อง ตำกระท้อนและผลสุกรับประทานเป็นผลไม้ และสรรพคุณทางยา โดยใช้ส่วนราก เพราะมีรสฝาด สามารถรักษาเป็นยาสามัญประจำบ้าน เช่น แก้ท้องร่วง บิดมูกเลือด ถอนพิษไข้ แก้ไข้รากสาด ดับพิษร้อนใน เป็นต้น

2.1.4.5 ตะลิงปลิง เป็นผลไม้ยืนต้นขนาดเล็กมีถิ่นกำเนิดในอินโดนิเซีย และพบตามชายทะเลในประเทศบราซิล แต่สามารถปลูกได้ทั่วทุกภูมิภาคทุกพื้นที่ของประเทศไทย เป็นพืชที่ปลูกค่อนข้างง่ายสามารถพบได้ตามสวนบ้าน ออกผลตามกิ่งก้านและลำต้นเป็นพวงแน่น ตะลิงปลิงเป็นผลไม้ที่อยู่ในตระกูลเดียวกับมะเฟือง เมื่อต้นโตเต็มที่จะมีความสูง 5-7 เมตร ผลกลมยาวปลายแหลม มีรสเปรี้ยวมาก

ประโยชน์ทางอาหาร ใช้แกง และรับประทานเป็นผลไม้ แกง จิ้มน้ำพริก ตะลิงปลิงมีสรรคุณทางยา เช่น แก้พิษร้อนใน กระหายน้ำ ฝาดสมาน บำรุงกระเพาะอาหาร แก้โลหิตตามกระเพาะอาหาร แก้ริดสีดวงทางทวาร แก้คัน แก้คางทูม เป็นต้น

2.1.4.6 ลูกตะขบหรือต้นอัมพวา เป็นพืชที่หายาก บางต้นมีอายุกว่าร้อยปี เป็นพืชดอกที่ออกตามต้น ดอกจะอยู่รวมกันเป็นกระจุก ก้านดอกมีเกล็ดสีน้ำตาลหุ้มอยู่รวมกันเป็นกระจุก ก้านดอกมีเกล็ดสีน้ำตาลหุ้มอยู่ดอกมีสีเหลือง ขาวแซมม่วงเล็กน้อยผลมีรูปร่างแบน คล้ายมะม่วง แต่มีรอยหยักไม่น่าดู ผลอ่อนมีสีน้ำตาลแกมเขียวเมื่อเจริญขึ้นมีสีเหลือง ผลดิบมีรสคล้ายมะม่วงดิบ เมื่อผ่ากลางจะมีลักษณะเมล็ดคล้ายมะม่วง ผลสุกขนาด ใหญ่ประมาณ ๒๐๐ กรัมมีสีเหลือง และเมล็ดสีน้ำตาล เมื่อออกผลแล้วนาน ๒ - ๓ เดือนจึงสุก

ประโยชน์ ใช้ได้โดยตรงจากผลที่สุก สามารถรับประทานผลสดได้เช่นเดียวกับผลไม้อื่นๆ แต่รสชาติต่างจากผลไม้อื่นๆ มีรสหวานอมเปรียว เนื้อกรอบ ถ้าสุกจะนิ่ม ทั้งกลิ่นและรสชาติคล้ายกับชมพู่สาแหรก

2.2 แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก คือ เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกเป็นสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ พบในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะในนม ผัก และผลไม้ ในการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มนี้ส่วนมากเป็นแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่ในสภาวะที่มีอากาศก็ไม่ตาย แบคทีเรียกรดแลคติกขาดสารไซโตโครม (Cytochomes) และฟอไฟร์ลิน (Porphyrins) จึงไม่ให้เอนไซม์คะตะเลสและออกซิเดส แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ออกซิเจนโดยผ่านเอนไซม์ฟลาโวโปรตีนออกซิเดส (Flavoprotien oxidases) และใช้ออกซิเจนนี้สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือ หรือใช้เพื่อออกซิไดส์ NADH ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการไฮโดรจิเนชันของน้ำตาล (สุมณฑา, 2549) แบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถในการ

หมักน้ำตาลกลูโคสและทำให้เกิดกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในการหมัก (นุชจิรา, 2551)แบคทีเรียกลุ่มนี้มีลักษณะทั่วไป คือ จัดอยู่ใน Family Lactobacillaceae สามารถย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลมและรูปร่างท่อน มีการจัดเรียงคู่ คู่สี่ และโซ่ยาว เป็นต้น ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (Axelsson, 1993)

แบคทีเรียกรดแลคติกจัดว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (generally recognized as safe bacteria; GRAS status) ซึ่งมนุษย์ได้นำมาใช้ประโยชน์มานานนับศตวรรษ โดยนำไปใช้ในการถนอมอาหารใช้เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหารหลายประเภท เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีคุณสมบัติที่เหมาะสมหลายประการ โดยสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคเทอริโอซิน(Bacteriocin) ก่อโรคทางระบบทางเดินอาหาร และกรดอินทรีย์ต่างๆ นอกจากนี้ยังสามารถสร้างเอกลักษณ์จำเพาะที่มีผลต่อลักษณะกลิ่นและรสชาติอาหาร(ภวัต,2544) แบคทีเรียกลุ่มนี้พบมากในอาหารหมักดอง

2.2.1 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria : LAB) เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ใน (family Lactobacillaceae) ย้อมติดสีแกรมบวก เซลล์จะมีรูปร่างทั้งแบบกลม (cocci) และแบบท่อน (rods) ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีการเคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส มีการจัดเรียงตัวเป็นสายโซ่ เป็นคู่ และเป็นกลุ่ม ทนต่อสภาวะที่มีอากาศ เจริญได้ในที่ที่มีอากาศ (aerobe) และที่ที่ไม่มีอากาศ (anaerobe) ทนความเป็นกรด ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ ขาดเอนไซม์ไซโตโครม และได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (สิรินดาและคณะ, 2554) แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิอยู่ในช่วง2-53 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอชที่เหมาะสม 5.58-6.20 แต่ทั่วไปแล้วเจริญได้ที่ pH น้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 โดยอัตราการเจริญเติบโตจะลดลงก็ต่อเมื่ออยู่สภาพที่เป็นด่างหรือเป็นกลาง (อัจฉรา, 2549)แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) สูง และมีความสำคัญในกระบวนการหมักเนื่องจากสามารถผลิตกรดและสารให้กลิ่นรส จึงนิยมมาใช้ในการประยุกต์วัตถุดิบอาหารและมาใช้ในการถนอมอาหาร ซึ่งสามารถสร้างสารได้หลายชนิด ได้แก่ เอทานอล กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) คาร์บอนไดออกไซด์ และไดอะซิติล (อุษณีย์ และคณะ, 2556)

2.2.2 แหล่งที่พบของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติและระบบย่อยอาหารของมนุษย์และสัตว์ และยังเป็นจุลินทรีย์ที่ปะปนมาในวัตถุดิบตามธรรมชาติ นอกจากนี้ยังพบได้ในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร และลำไส้ของมนุษย์ (กฤษณา, 2552) แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถคัด

แยกได้จากอาหารหมัก (fermented food) อาหารหมักดองทั่วไป ที่สามารถพบได้ง่ายคือ อาหารหมักจากนม เช่น เนยแข็ง โยเกิร์ต นมเปรี้ยว และยังพบในผักดอง ผลไม้ดอง ผลิตภัณฑ์จากข้าว ผลิตภัณฑ์จากเนื้อและปลา (สิรินดา และคณะ, 2554)

2.2.2.1 อาหารหมักดองจากพืช

ผักที่นิยมนำมาดอง ได้แก่กะหล่ำปลี หอม แตงกวา หน่อไม้ และผลไม้ที่นิยมนำมาดอง ได้แก่ มะขาม มะม่วง มะกอก เป็นต้น ปัจจุบันการแปรรูปมีทั้งระดับครอบครัวและดองเป็นอุตสาหกรรมเพื่อการค้าในประเทศไทยผักดองในลักษณะนี้ซึ่งเป็นที่รู้จักกันทั่วไปได้แก่ ผักเสี้ยนดอง หน่อไม้ดอง หอมดอง ผักกาดดอง ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในการดองผักเสี้ยนได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. buchineri*, *L. fermentum* และ *Pediococcus cerevisiae* (ปิ่นมณี, 2547)

2.2.2.2 อาหารหมักที่ได้จากสัตว์

ผลิตภัณฑ์นม ได้แก่ นมเปรี้ยวมักพบ *Lactobacillus acidophilus* และ *L. bifidus* ในยาคูลท์มักพบ *L. casei* ในโยเกิร์ตมักพบ *Lactobacillus bulgaricus, Bifidobacterium* sp., *L. acidophilus* และ *Streptococcus themophilus* ในเนยแข็งมักพบ *Leuconostoc* sp., *Lactococcus cremoris* และ *Lc. Lacctis* (Schrezenminer and de Verse, 2001)

ผลิตภัณฑ์จากเนื้อ ได้แก่ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว มักพบแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum, L. brevis และ Pediococcus* sp. (Swetwiwathana et al., 2009)

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปลา ได้แก่ ปลาร้า ปลาเจ่า ปลาส้มฟักไตปลาและไข่ปลาดอง มักพบ *Lactobacillus plantaram, Lueconostoc* sp, *Pidiococcus acidococcus* และ *Streptoccoccus* sp. (Swetwiwathana et al., 2009)

2.3 การจัดกลุ่มและจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกมีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่อง ในอดีตนั้นอาจหมายถึงกลุ่มโคลิฟอร์มด้วย ปัจจุบันแม้ไม่มีนิยามที่ชัดเจนและเป็นเอกฉันท์แต่ลักษณะพื้นฐานซึ่งยอมรับทั่วไปของแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ขาดเอนไซม์ไซโตโครม ทนต่อสภาวะมีอากาศ (Aerolerant) ทนต่อความเป็นกรด ต้องการอาหารสูงต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลังจากการหมักน้ำตาล

2.3.1 กลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกเมื่อแบ่งตามรูปร่างและการเรียงตัว สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม

2.3.1.1 เชื้อรูปร่างแท่งหรือท่อน ได้แก่ *Lactobacillus*, *Bifidiobacterium* และ *Carneobacterium*

2.3.1.2 เชื้อรูปร่างกลม โดยมีการแบ่งเซลล์ 2 ระนาบเป็น 4 เซลล์ ได้แก่ *Aerococcus, Tetragenococcus* และ *Pediococcus*

2.3.1.3 เชื้อรูปร่างกลมคู่หรือสายโซ่ ได้แก่ *Streptococcus, Enterococcus Lactococcus, Vagococcus* และ *Leuconostoc* (อัจฉรา, 2549)

2.3.2 กระบวนการหมักกรดแลคติก

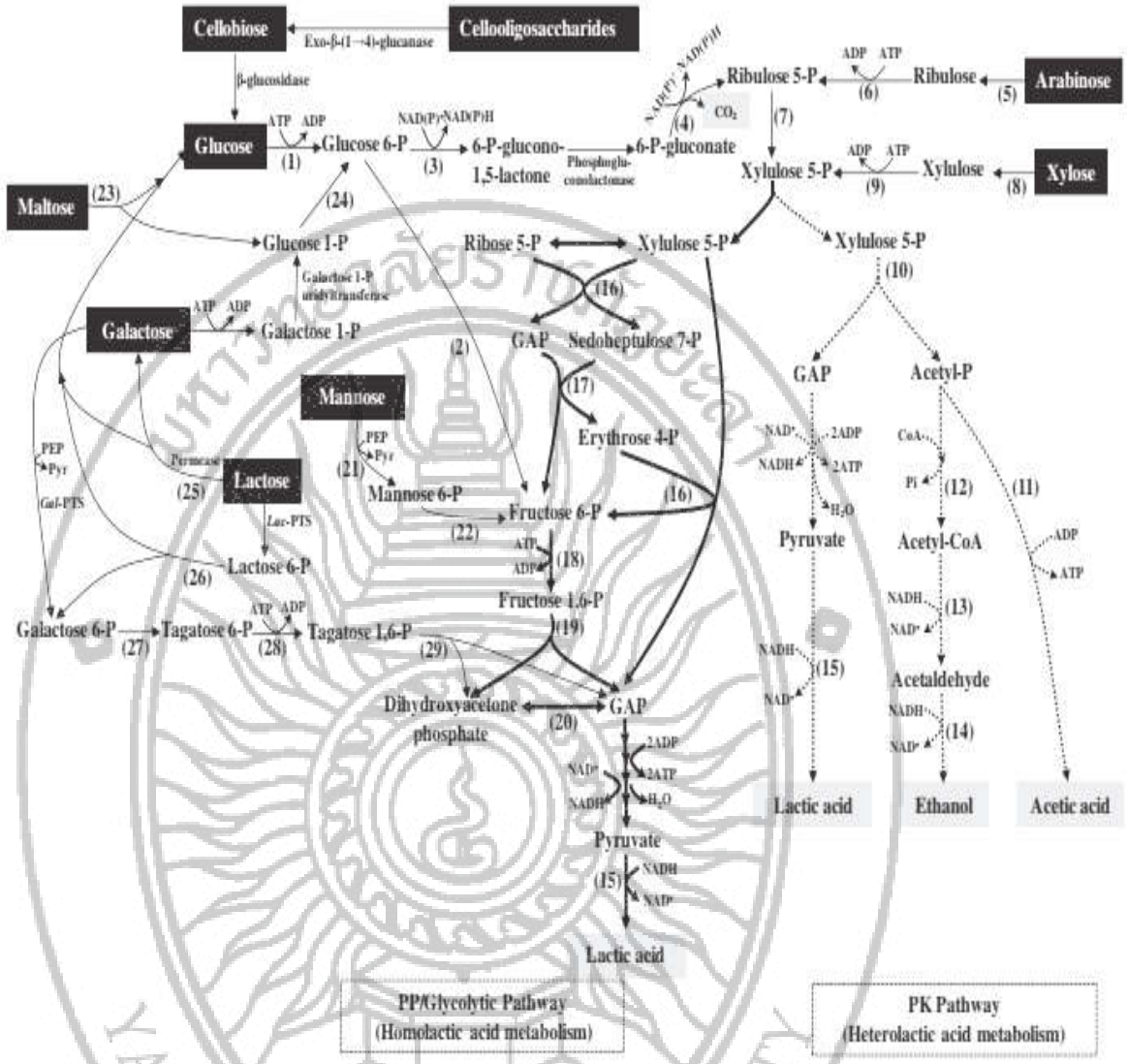
กระบวนการหมักที่กิดกรดแลคติกจะมีระดับความเป็นกรดสูง เนื่องจากมีค่า pH ต่ำทำให้ประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น-รีดักชั่นต่ำ ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการ ในกระบวนการหมักกรดแลคติก (จิราวรรณ, 2547) แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถแบ่งตามความสามารถในการหมักน้ำตาลได้ 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ homofermentative และ heterofermentative

2.3.2.1 Homofermentative

สามารถสร้างกรดแลคติกได้ 85-95% จากการหมักน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัว โดยมีกระบวนการหมักแบบ homolactic acid metabolism ซึ่งจะใช้วิธี glycolysis หรือ Embden-Meyerhof lactic (EMP) โดยจะสลายกลูโคส จึงเป็นกระบวนการหมักที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น pyruvate จากนั้นเปลี่ยน pyruvate เป็นกรดแลคติกด้วยเอนไซม์ Lactate dehydrogenase และจะได้กรด แลคติก 2 โมเลกุล ต่อ glucose 1 โมเลกุล สามารถแบ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ พวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เรียกว่า Streptobacterium และไม่เจริญที่ 15 องศาเซลเซียส เรียก Thermobacterium ดังแสดงในภาพที่ 2.1

2.3.2.2 Heterofermentative

สามารถสร้างกรดแลคติกได้ 50% จากการหมักน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัว และได้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงอื่นๆคือ acetic acid, ethanol และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ มีคาร์บอนไดออกไซด์ มีกระบวนการหมักเป็นแบบ heterolactic acid metabolism หรือ pentose phosphate pathway หรือ pesphate patway ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 กระบวนการหมักแบบ Homofermentative และ Heterofermentative ที่มา (Mohamed A. A. et al., 2013 หน้า 293)

2.4 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติก

การนิยามและการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria; LAB) มีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะช่วง 10 – 20 ปีที่ผ่านมาในอดีตนั้นหมายถึงกลุ่มแบคทีเรียที่ทำให้น้ำนมเปรี้ยวจากการผลิตกรดซึ่งรวมถึงแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มโคลิฟอร์มด้วย ปัจจุบันแม้ไม่มีนิยามที่ชัดเจนและเป็นเอกฉันท์ แต่ลักษณะพื้นฐานซึ่งยอมรับทั่วไปของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือเป็นกลุ่มแบคทีเรีย

แกรมบวกซึ่งไม่สร้างสปอร์ขาดเอนไซม์คะตะเลสขาดไซโตโครมทนต่อสภาวะมีอากาศ (aerotolerant) ทนต่อความเป็นกรดต้องการสารอาหารสูงในการเติบโตและผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักน้ำตาลอย่างไรก็ตามแบคทีเรียกลุ่มนี้บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียม

ในปี ค.ศ 1919 Orla-jensen ได้ริเริ่มจัดอนุกรมวิธานแบคทีเรียกรดแลคติก โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชนนิดของกนะบวนการหมักน้ำตากลูโคส ความสามารถในการใช้น้ำตาลแต่ละชนิดและความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆสามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็น7 จีนัส ได้แก่ *Batabacterium, Thermobacterium, Streptobacterium, Streptococcus, Betacoccus, Microbacterium* และ*Tetranococcus* (พิเชษฐ์, 2548)

ในปี ค.ศ 1995 Wood และ Holzapfel ได้จัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกเป็น 9 จีนัส ได้แก่ *Batabacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus* และ *Sporolactobacillus* ในปัจจุบันนี้ได้มีการนำความรู้ทางด้านวิทยาศาสตร์เข้ามาใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับจีนัสและสปีชีส์ โดยพิจารณาความแตกต่างของชนิดกรดนิวคลีอิกบนดีเอ็นเอ (DNA-DNA homology) ความใกล้ชิดสายวิวัฒนาการ (phylogeny) โดยดูจากลำดับเบสบน ribosomal ทำให้การจัดจำแนกมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น Stiles and Holzapfel (1997) และ Axelesson (1990) ซึ่งขาดกลุ่มพอร์ไฟริน (porphyrin group) และในสภาวะจำกัดสารอาหารกลุ่ม *Streptococci* เช่น *Streptococcus bovis* มีการผลิตกรดแลคติกเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Axelsson, 1998)

2.4.1 การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับจีนัส

ปัจจุบันการจำแนกจีนัสของแบคทีเรียแลคติกอาศัยลักษณะการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยาและชีวเคมี ทำให้มีความถูกต้องมากขึ้นในด้านอาหาร แบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญต่ออาหารหมักหลายชนิด ได้แก่ ผลไม้ดอง ผักดอง โยเกิร์ต ไส้กรอกเปรี้ยว แหนม ปลาหมักชนิดต่างๆ รวมทั้งหน่อไม้ดองซึ่งในปัจจุบันมีการบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศและต่างประเทศแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถจำแนกได้เป็น 12 สกุล ดังนี้

2.4.1.1 *Streptococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 –1.2 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือคู่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์จากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ มีหลายสปีชีส์เป็นปรสิตในคนหรือสัตว์และบางสปีชีส์สามารถทำให้เกิดโรคได้เจริญที่อุณหภูมิ 20- 41องศาเซลเซียส

2.4.1.2 *Vagococcus* เป็นแบคทีเรียแลคติกที่เคลื่อนที่ได้ (ไม่ทุกสายพันธุ์) ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ *Vagococcus flauvalis* ซึ่งเดิมอยู่ใน *Streptococci* และ *V. samoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค

2.4.1.3 ***Lactococcus*** เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5–10 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) จากการหมักกลูโคส มักใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทนม สามารถเจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียส แต่มักไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส พบในแหล่งต่าง ๆ เช่น ผักกาด ถั่ว หญ้า มันฝรั่ง น้ำนมดิบ เป็นต้น

2.4.1.4 ***Enterococcus*** เซลล์มีรูปไข่ จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือสายโซ่สั้นๆผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ สามารถเจริญที่ 10 หรือ 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียมได้

2.4.1.5 ***Pediococcus*** เซลล์มีรูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36 – 1.43 ไมครอน แบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์ 4 เซลล์ติดกันคล้ายจัตุรัส (tetrad formation) ในสภาวะไม่มีอากาศ ผลิตกรดแลคติกชนิด DL และ L(+) จากการหมักกลูโคส บางสปีชีส์ทำให้เบียร์และไวน์เสีย

2.4.1.6 ***Tetragenococcus*** มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* เนื่องจากเดิม คือสปีชีส์ *P. halophilus* ซึ่งจัดจำแนกใหม่จากการเจริญในอาหารซึ่งมีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง18 % และมีลำดับเบสบน 16s rRNA ใกล้เคียงกับเชื้อสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม

2.4.1.7 ***Aerococcus*** มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* ประกอบด้วย 2 สปีชีส์คือ *Aerococcus viridians* และ *A. urinae* ซึ่งเปลี่ยนแปลงจาก *P. homari* และ *P. urinaequi* ตามลำดับ โดย *A. viridians* ทำให้กุ้งลอบสเตอร์เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในคน

2.4.1.8 ***Lactobacillus*** เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุดมีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์สมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา เนื่องจากมีความแตกต่างของโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+Cภายในโมเลกุลสูงระหว่าง 32-53 เปอร์เซ็นต์ (Axelsson,1998) พบได้ในแหล่งต่างๆที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบต่างๆ เช่น เยื่อเหมือกของมนุษย์ สัตว์ พืช อาหารที่เน่าเสีย เป็นต้น บางชนิดเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในมนุษย์ เซลล์มีรูปร่างท่อนหรือท่อนสั้น (coccobacilli*)* *Lactobacillus*ประกอบด้วย 55 ชนิด ซึ่งถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม (Stile and Holapfel, 1997)

1) กลุ่ม Obligate homofermentative lactobacilli เป็นกลุ่มที่สามารถหมักน้ำตาลแลคโทสได้เป็นกรดแลคติกได้มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์โดยวิธี Embden – Meyerhof – Parnas (EMP) ผลิตเอนไซม์ 1,6 biphosphate – aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสและกลูโคเนทไม่ได้ประกอบด้วย 18 สปีชีส์

2) กลุ่ม Facultatively heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลคติกผ่านวิถี EMP มีการผลิตเอนไซม์ทั้ง aldolase และ phosphoketolase จึง

หมักน้ำตาลเพนโทสได้กลุ่ม Obilgately heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทสผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนทเป็นแลคติก, เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์

3) กลุ่ม Obligate heterofermentative lactobacilli สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสได้เป็นกรดแลคติกผ่านวิถี EMP มีการผลิตเอนไซม์ adaolase และ phosphoketolase จึงสามารถหมักน้ำตาลเพนโทสได้ (Tuber, 1995)

2.4.1.9 *Oenococcus* ประกอบด้วยสปีชีส์เดียวคือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนจาก *Leuconostoc* ด้วยสมบัติการทนกรดและเอทานอลปริมาณสูง รวมทั้งข้อมูลทางพันธุกรรมจากดีเอ็นเอ : ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นและลำดับเบสของ 16s rRNA ต่างจากสปีชีส์อื่นในสกุล *Leuconosto*c

2.4.1.10 *Weissella* ประกอบด้วยแบคทีเรีย 7 สปีชีส์ ซึ่งลักษณะคล้าย *leuconostoc* (leuconosdoc – like bacteria) รูปร่างเซลล์เป็นแท่งและกลม มีสปีชีส์ซึ่งเดิมอยู่ในสกุล*Leuconostoc* และ *Lactobacillus* คือ *Leuc. paramesenteroides (Weissella paramesenteroides) Lactobacillus confusus (W. confusus) Lb. halotolerans (W. halotoleran) Lb. kandleri (W. kandleri) Lb. minor (W. minor) Lb. viridescens (W. viridescen)* และสปีชีส์ใหม่ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกหมักคือ *W. hellenica* (Stiles and Holzapfel, 1997)

2.4.1.11 *Leuconostoc* เซลล์มีสัณฐานขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหารซึ่งมีกลูโคสเซลล์มีลักษณะยืดออกคล้ายกลุ่ม lactobacilli แต่ในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลมการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวอยู่เป็นคู่หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลางผลิตกรดแลคติกชนิด D(-) เอทานอลคาร์บอนไดออกไซด์และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคสจึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดองการเจริญต้องการสารอาหารสูงปัจจุบันประกอบด้วย 8 สปีชีส์ *Leuconostoc mesenteroides, Leuc. lactis, Leuc. gelidum, Leuc. carnosum, Leuc. pseudomesenteroides, Leuc. citreum, Leuc. argentinum* และ*Leuc. Fallax* (Stiles and Holzapfel, 1997) มี mol % G + C ระหว่าง 37 - 40 % (Dellaglio และคณะ, 1995)

2.4.1.12 *Carnobacterium* เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรง ขนาดสั้นถึงปานกลางหรือเป็นท่อนเรียว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 – 0.7 ไมครอน และยาว 1.1 – 3.0 ไมครอน โดยจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์คู่ มักไม่พบการเรียงเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติก ชนิด L(+) คาร์บอนไดออกไซด์อะซีเตท และเอทานอลจากการหมักน้ำตาลเฮกโซส (สุพรรณิการ์, 2548)

2.4.2 ลักษณะและวิธีการที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

2.4.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology)

พิจารณาจากรูปร่างเซลล์ การจัดเรียงตัวการเคลื่อนที่ การย้อมติดสีแกรม การสร้างแคปซูล พบว่าจีนัส *Pediococcus, Lactococcus, Streptococcus*และ *Enterococcus* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน สามารถแยกออกจากจีนัสอื่นได้ ในขณะที่จีนัส *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ *Lactobacillus* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันออกไปจากกลุ่ม *Bifidobacterium* และแบคทีเรียกรดแลคติกจีนัส *Streptococci* โดยจีนัส *Lactococcus*, *Enterococcus* และ *Streptococcus* อย่างไรก็ตาม สภาวะการเจริญและระยะเวลาในการเจริญของเซลล์ อาจมีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์

2.4.2.2 ลักษณะทางสรีระวิทยา (Physiology)

เกี่ยวข้องกับความต้องการออกซิเจน อุณหภูมิ ความเข้มข้นของอิออน pH และ Hydrostatic pressure ใช้แยกความแตกต่างระหว่าง *Lactobacillus*และ *Carnobacterium* โดย *Carnobacterium* ไม่สามารถเจริญที่ pH 4.5 หรือบนอาหารเพาะแข็งแอซีเทต แต่สามารถเจริญได้ที่ 9.0 สำหรับแยกความแตกต่างของเชื้อในกลุ่มใหญ่โดยวิธีการทดสอบทางสรีระวิทยาอาจไม่เพียงพอ อาจจะต้องใช้วิธีการทดสอบอื่นๆเพิ่มเติมด้วย

2.4.2.3 การหมักแหล่งคาร์บอน (Carbohydrate fermentation)

อาศัยความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิด ในการใช้สารอาหารและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเมแทบอลิซึม โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้น และรูปแบบการหมักสารประเภทคาร์โบไฮเดรต จากการเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ในอาหารเพาะเชื้อที่ใส่ธาตุอาหารบางอย่างลงไป แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในอาหารเพาะเชื้อ เช่น การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเพาะเชื้อ การเกิดกรด การเกิดก๊าซ และการเกิดสารบางชนิด เป็นต้น

2.4.2.4 ส่วนประกอบของผนังเซลล์ (cell wall composition)

อาศัยลักษณะการมีหรือไม่มีของสารบางชนิดในผนังเซลล์ เช่น meso-diaminoopimelic acid สามารถตรวจสอบโดยใช้วิธี thin-layer chromatography ซึ่งเหมาะสำหรับกรณีในจีนัสมีสายพันธุ์อยู่เป็นจำนวนมาก เช่น ลักษณะเด่นของผนังเซลล์จีนัส *Lactobacillus* มีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบ lysine–denylalanine-aspartate

2.4.2.5 Electrophoretic mobility of lactate dehydrogenase

ในกระบวนการหมักแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตกรดแลคติกได้เป็นชนิด D,L หรือทั้ง 2 ชนิด ทั้งนี้ขึ้นกับการมีเอนไซม์ NAD^+- dependent lactate dehydrogenase (nLDH) ชนิด D-nLDH หรือ L-nLDH ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีรูปแบบของเอนไซม์แต่ละชนิดต่างกัน ดังนั้น จึงสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียได้โดยอาศัยหลักของวิธีการ gelelectrophoresis เพื่อจัดจำแนก

เอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) บน starch gel หรือ polyacrylamine gel ใช้จำแนกความแตกต่างของเชื้อที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันมาก เช่น *Lb. crispatus*, *Lb. gallinarum*, *Lb. gasseri* และ *Lb. johnsonii*

2.4.2.6 SDS-PAGE of whole cell protein

อาศัยหลักการเชื้อที่มีสายพันธุ์ต่างกันที่จะให้รูปแบบของโปรตีนที่ไม่เหมือนกันโดยที่มีการเปรียบเทียบลักษณะของโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ซึ่งอาจจะใช้โดย Sodium dodecyl sulphatepolyacrylamine gel electrophoresis (SDS-PAGE) สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว ให้ผลถูกต้องแม่นยำในระดับสปีชีส์และสับสปีชีส์ สามารถช่วยในการจัดจำแนกเชื้อที่มีปัญหาในการแบ่งหมวดหมู่ได้ เช่น *Lactobacillus kefir*, *Lb. ruteri* สายพันธุ์ของ *Leuconostoc* และ *Lactococcus*

2.4.2.7 การศึกษาเบสองค์ประกอบของดีเอ็นเอ (DNA base composition)

เป็นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย โดยการเปรียบเทียบเบสองค์ประกอบของดีเอ็นเอซึ่งแสดงในรูปของ mol% G+C พบว่าแบคทีเรียที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันจะมีค่า mol% G+C ใกล้เคียงกันแต่บางครั้งแบคทีเรียที่ไม่สัมพันธ์กันอาจมีค่าmol% G+C ใกล้เคียงกันได้ ดังนั้นวิธีการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ถูกต้องและแม่นยำกว่าคือ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการศึกษาดีเอ็นเอที่สามารถเข้าคู่กันได้ (DNA-DNA hybridization) อาศัยหลักการคือดีเอ็นเอจำเพาะจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีความเหมือนกัน และสามารถเข้าคู่กันได้ วิธีนี้ทำโดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำเพาะใช้เป็น probe โดยติดฉลาก ซึ่งอาจติดโดยใช้สารกัมมันตรังสี (radioactive label) หรือสามารถใช้สารปลอดรังสี (non-radioactive label)จากนั้นนำ probe ที่ได้ไปทำ hybridization กับดีเอ็นเอตัวอย่างของเชื้อที่ต้องการตรวจสอบ ถ้าสามารถเข้าคู่กันหรือจับกันได้

2.4.2.8 การศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสของ rRNA (rRNA sequence)

วิธีนี้ใช้จำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ โดยการวิเคราะห์ลำดับของ rRNA sequencing ทำโดยการเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการโดยวิธี PCR แล้วนำ sequence จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้ไปเปรียบเทียบลำดับเบสใน GenBank เพื่อตรวจว่าคือเชื้อใด

2.4.2.9 เซรุ่มวิทยา (Serology)

เป็นวิธีการสำคัญในการแยกและจำแนกเชื้อในจีนัส *Streptococcus* ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์ โดยอาศัยคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนที่จำเพาะของผนังเซลล์ที่แตกต่างกันซึ่งทำให้จัดแบ่งเป็นกลุ่มซึ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนขององค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรีย เช่น การมีแอนติเจนที่เป็นสารประกอบของพอลิแซคคาไรด์ที่ผนังเซลล์โดยจัดจำแนกได้เป็นกลุ่ม A และ G หรือการมีกรดไทโคอิกระหว่างชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ และของผนังเซลล์ชั้นในโดยจัดจำแนกได้เป็นกลุ่ม D เช่น *Streptococcus pyrogenes* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการเจ็บคอจัดอยู่ในกลุ่ม A ส่วน *S. faecalis* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะจัดอยู่ในกลุ่ม D ส่วน

Lactobacillus เมื่อใช้ลักษณะทางเซรุ่มวิทยา สามารถแบ่งกลุ่มได้ 7 กลุ่มตั้งแต่ A-G ตามชนิดของแอนติเจน

2.4.2.10 การศึกษารูปแบบพลาสมิด (Plasmid profile)

แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดจะมีพลาสมิดอยู่ในเซลล์ ซึ่งจะควบคุมคุณสมบัติพิเศษบางอย่างของเชื้อ เช่น การผลิตเมือก การผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เป็นต้น โดยพลาสมิดของเชื้อชนิดเดียวกันจะมีจำนวน ขนาด และลำดับเบสที่เหมือนกัน เมื่อแยกพลาสมิดออกจากเซลล์ นำมาตัดโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ทราบการตัดตำแหน่งที่แน่นอน แล้วจึงนำมาทำเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส (gel electrophoresis) โดยถ้าเป็นเชื้อชนิดเดียวกันจะมีรูปแบบการเคลื่อนที่ที่เหมือนกัน ความหลากหลายของจำนวนและขนาดของพลาสมิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในชนิดเดียวกันจะใช้เป็นลักษณะสำคัญสำหรับการกำหนดลักษณะ และใช้จำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกออกจากกัน

2.5 แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสำคัญในด้านโพรไบโอติก

2.5.1 ความหมายของโพรไบโอติก

โพรไบโอติกมีการใช้ครั้งแรกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1965 เพื่ออธิบายปรากฏการสนับสนุนการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งกับอีกชนิดหนึ่ง คำว่า “โพรไบโอติก” หมายถึง สารที่สามารถกระตุ้นจุลินทรีย์ชนิดอื่น ต่อมาจึงได้มีผู้ทำการเกี่ยวกับโพรไบโอติกอย่างกว้างขวางและสรุปว่า โพรไบโอติก เป็นจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน (host) มีผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้ มีสมบัติที่ทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร และทนต่อเกลือน้ำดีต่อลำไส้ สามารถผลิตกรดแลคติก และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้ อีกทั้งยังทำให้เกิดสมดุลในระบบการย่อยอาหาร การขับถ่าย ช่วยในการพัฒนาสุขภาพมนุษย์และสัตว์ให้ดีขึ้น (นวลจันทร์ 2533; kontula et al. 1998)

แบคทีเรียสกุล *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Entrococcus, Bifidobacterium, Propionibacterium* และเห็ดราในจีนัส *Saccharomyces* แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบได้ทางระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์และอาหารหมักต่างๆที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ซึ่งได้แก่ *Lactobaciilus, Bifidobacterium* และ *Entrococcus* (Hoover, 1993) ได้รวบรวมชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการผลิตนมหมัก ในปัจจุบันมีอยู่ 3 ชนิด ที่มีวัตถุประสงค์ในการส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์และสัตว์มีอยู่ 3 ชนิด ที่มีวัตถุประสงค์ในการส่งเสริมสุขภาพและจัดเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก คือ *Bifidobacterium* sp. *L.casei, L. acidophillus* ซึ่งมีคุณสมบัติดังนี้

2.5.1.1 *Bifidobacterium* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ติดสี Acid fast เคลื่อนที่ไม่ได้ และไม่สร้างสปอร์ ลักษณะเซลล์เป็นรูปแท่งที่มีหลายแบบเช่น เป็นแท่งสั้น เซลล์ผอม

หรือปลายเรียวแหลม เป็นต้น ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญที่เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37-41 องศาเซลเซียส ค่า pH ที่เหมาะสมที่ pH 6.5-7.0 สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดอะซิติกและกรดแลคติก

2.5.1.2 ***Lactobacillus casei*** เป็นแบคทีเรียแกรมบวก หมักน้ำตาลกลูโคสแบบ homofermintative เป็น mesophiles สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิไม่เกิน 37 องศาเซลเซียส สามารถพบได้ในนมสด เนยแข็ง และผลิตภัณฑ์ต่างๆ

2.5.1.3 ***Lactobacillus acidophilus*** เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างปลายมนอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือสายสั้นๆ มีการหมักน้ำตาลเฮกโซส แบบ homofermentative แยกได้จากลำไส้ของคนละสัตว์ ช่องปากและช่องคลอดของคน เจริญได้ตั้งอุณหภูมิ 15-45 องศาเซลเซียส จัดเป็นแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิ

2.5.2 ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกมีประโยชน์ต่ออาหารหมักหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นอาหารหมักจำพวกแป้ง ธัญพืช อาหารหมักจากนม ซึ่งในเชิงการค้ากรดแลคติกสามารถผลิตโดยการสังเคราะห์ทางเคมีหรือการหมักแบคทีเรียโดยการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้น (กนกและนงพงา, 2555) นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถช่วยในการลดระยะเวลาในการหมักและเกิดความปลอดภัยตามมาตรฐาน (generally recognized as safe bacteria; GRAS status) และเซลล์แบคทีเรียเองยังเป็นสารเสริมปฏิชีวนะ (Probiotic) เพื่อปรับสมดุลของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์ที่ปะปนมาในวัตถุดิบตามธรรมชาติ และใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นสารอาหารในกระบวนการหมักส่งผลต่อการลด pH ในผลิตภัณฑ์ และทำให้เชื้อเจริญเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วหลังจากการหมัก 1 - 2 วัน (กฤษณา, 2552) กิจกรรมการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ก่อให้เกิดสารเมแทบอลิซึมในอาหารหมัก เช่นกรดแลคติก ซึ่งเป็นตัวการทำให้เกิดลักษณะกลิ่นรสที่เฉพาะ รวมทั้งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และแบคทิริโอซิน ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ (สุพรรณิการ์, 2547) กระบวนการหมักแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดขึ้นจะช่วยแปรรูปทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ๆที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัวทั้ง กลิ่นรสชาติ และเนื้อสัมผัส เช่น การเปลี่ยนแปลงของนมให้กลายเป็น นมเปรี้ยว เนยแข็ง และโยเกิร์ต (วรายุทธ และคณะ, 2550) แบคทีเรียกรดแลคติกนิยมมาใช้ในการถนอมอาหารและมีความสำคัญมากต่ออุตสาหกรรมการผลิตอาหาร ในปัจจุบันอาหารที่หมักโดยแบคทีเรียกรดแลคติกมีการบริโภคกันอย่างแพร่หลายและยังมีศักยภาพในการพัฒนาสู่การส่งออกจำหน่ายในต่างประเทศ ผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการหมักสารคาร์โบไฮเดรตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก คือ กรดแลคติก และยังให้ผลผลิตบางชนิดได้ สารที่ให้กลิ่น จึงจัดว่ามีความสำคัญต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร (ประวัติ และคณะ, 2550)

2.6 แบคทีเรียก่อโรค

2.6.1 เชื้อ *Esherichia coli* (*E. coli*)

E. coli เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่พบบ่อยในลำไส้คนและสัตว์ โดยเชื้อ *E. coli* ส่วนใหญ่จะไม่ก่อโรคในคน แต่ก็ยังมีเชื้อ *E. coli* บางสายพันธุ์ ที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารและระบบอื่นๆในร่างกายได้ทั้งคนและสัตว์โดยส่วนใหญ่มีการปนเปื้อนลงในอาหารและน้ำดื่ม

2.6.1.1 ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

E. coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง มีขนาดตั้งแต่ 1.1-1.5 x 2.0-6.0 ไมโครเมตร สายพันธุ์ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ โดยอาศัยแฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบตัว ไม่สร้างสปอร์สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และที่ไม่มีออกซิเจน ปกติสามารถเจริญบนอาหารธรรมดาที่ใช้ในห้องปฏิบัติการที่ช่วงอุณหภูมิ 7-46 องศาเซลเซียส pH ของอาหารตั้งแต่ 4.4-10 มีแคปซูลบางๆ หุ้มอยู่รอบตัวทำให้เชื้อทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆได้ดี เช่น มีชีวิตอยู่ตามเสื้อผ้าแห้ง และในฝุ่นละอองได้หลายวัน อยู่ในน้ำได้หลายสัปดาห์ แต่ถูกทำลายเมื่อต้ม 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2.6.1.2 การจัดจำแนก *E. coli* ตามคุณสมบัติของแอนติเจน

1) Somatic antigen เป็นสารประกอบ lipopolysaccharide พบอยู่ในผนังเซลล์ มีคุณสมบัติทนความร้อน 121 องศาเซลเซียส ทนกรดอ่อน ปัจจุบันมีอยู่ประมาณ 171 ชนิด

2) Capsule antigen (K-antigen) เป็นสารประกอบพอลิเซกคาไรด์มักพบห่อหุ้มเซลล์ เช่น แคปซูล ฟิมเบรียที่หุ้มตัวแบคทีเรียจะคลุม O-antigen ทำให้เชื้อไม่สามารถเกาะกลุ่มในแอนติเซรั่ม O ยกเว้น จะทำลาย K-antigen เสียก่อน โดยการต้มที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง

3) Flagella antigen (H-antigen) เป็นส่วนของแฟลกเจลลา ประกอบด้วยโปรตีนที่เรียกว่า แฟลกเจลลิน ถูกทำลายที่ 100 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ที่ไม่เคลื่อนที่จะไม่พบ H-antigen ปัจจุบันมีอยู่ประมาณ 56 ชนิด

ดังนั้นในการจัดจำแนกและแยกชนิดของเชื้อขึ้นอยู่กับแอนติเจนเหล่านี้ เช่น *E. coli*, O175:H7, O6:K15:H16, O142:H6 เป็นต้น

2.6.1.3 การเกิดโรค

เชื้อ *E. coli* ที่ก่อให้เกิดโรคอุจจาระร่วงในคนแบ่งเป็น 5 กลุ่ม ตามกลไกการก่อโรค ดังนี้

1) Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) ก่อโรคอุจจาระร่วงในผู้ป่วยทุกกลุ่มอายุ แต่จะพบมากในเด็กที่อายุต่ำกว่า 5 ปี ทำให้เกิดอุจจาระร่วงเรียกว่า travreler diarrhea เกิดโรคโดยการรับประทานอาหารหรือดื่มน้ำที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ ปัจจัยที่ทำให้สามารถก่อโรคของเชื้อ คือ

เชื้อจะมี colonization factor antigen (CFA) ที่อยู่บนผิวของฟิมเบรีย ทำให้เกาะที่ผิวของเซลล์เยื่อบุลำไส้เล็ก และสร้างพิษ ออกมาทำลายเซลล์เยื่อบุลำไส้

2) Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) ก่อเกิดอุจจาระร่วงในผู้ป่วยทุกกลุ่มอายุ โดยรับประทานอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ EIEC ผู้ป่วยจะมีอาการและกลไกลการก่อโรคคล้ายโรคบิด ที่เกิดจากเชื้อ Shigellaคือ เชื้อมี invasive virulence factor ซึ่งถูกควบคุมโดยยีนบนพลาสมิด ทำให้เชื้อสามารถสังเคราะห์โปรตีน ช่วยให้เชื้อสามารถแทรกตัวเข้าไปใน epithelial cell ของลำไส้ใหญ่ เชื้อแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนมากภายในเซลล์ทำให้เซลล์แตก

3) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) เป็นสาเหตุสำคัญในโรคอุจจาระร่วงในเด็กแรกเกิดอายุต่ำกว่า 18 เดือน มักพบระบาดของเชื้อ EPEC ในห้องเลี้ยงเด็กในโรงพยาบาลและสถานรับเลี้ยงเด็ก เชื้อ EPEC ไม่สร้าง entero toxin ไม่มี invasive virulence factor กลไกลการก่อโรคยังไม่ทราบแน่ชัด

4) Enteroaggregative *E. coli* (EaggEC) เป็นสาเหตุอุจจาระร่วงและปัญหาในเด็กเล็ก โดยเฉพาะเด็กที่อายุต่ำกว่า 1 ปี เด็กมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ถ่ายเหลวเป็นน้ำ คุณสมบัติพิเศษของเชื้อ คือ สามารถเข้าเกาะกับเนื้อเยื้อเพาะเลี้ยง Hep-2 cell หรือ Hela cell ด้วยรูปแบบ aggregative (AA)

5) Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) ทำให้เกิดอุจจาระร่วงที่เรียกว่า hemorrhagiccolitisเชื้อ EHEC จะใช้ ฟริมเบียร์ เข้าเกาะกับเยื่อบุผนังลำไส้ตรงส่วน caecum และ colon แล้วสร้างสารพิษที่มีคุณสมบัติคล้าย Shiga toxin ที่สร้างจาก Shigella dysenteriae type 1 จึงเรียกสารพิษนี้ว่า Shiga-like toxin

2.6.2 เชื้อ *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

2.6.2.1 ลักษณะและคุณสมบัติของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม มักพบเป็นคู่เกาะสั้นๆ เป็นกิ่งหรือลักษณะพวงองุ่น (Spherical shape) สามมารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (Facultative anaerobes) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ15-45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในระดับความเข้มข้นของเกลือสูงถึง 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เชื้อบริเวณเนื้อเยื่อ และโรคอาหารเป็นพิษ (Todar, 2005)

2.6.2.2 โครงสร้างที่มีคุณสมบัติเป็นเอนติเจนต่างๆ

1) แคปซูล (Capsule) เป็นโครงสร้างที่หุ้มอยู่ชั้นนอกสุดของเซลล์ การสร้างแคปซูลจะพบในสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงทำให้เกิดโรค เชื้อ *S. aureus* สามารถสร้างแคปซูลเมื่ออยู่ในสิ่งมีชีวิต อาจสูญเสียการสร้างไป เมื่อมีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สายพันธุ์ที่สร้างแคปซูลได้นั้นไม่สามารถใช้วิธีการจัดจำแนกด้วย phage (phage typable) และไม่สามารถสร้างเอนไซม์โคแอคกูเลสชนิดติดกับเซลล์

2) กรดไทโคอิก (Teichoic acid) เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่มีฟอสเฟตชนิดจำเพาะสายพันธุ์ (species-specific carbohydrate antigens) เชื้อชนิดที่สร้างแอนติเจนนี้ ได้แก่ *S. aureus* ที่มี polysaccharide A และ *S. epidermidis* ที่มี polysaccharideB

3) โปรตีนเอ (Protein A) เป็นโปรตีนที่ผนังเซลล์ชั้นเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) (Murray et al. 1990)

4) เอนไซม์โคแอคกูเลส ชนิดติดกับเซลล์อาจเรียกได้ว่า Clumping factor สร้างโดย *S. aureus* สายพันธุ์ไม่สร้างแคปซูล โดยจะเกาะกันเมื่ออยู่ในพลาสมา (plasma) ที่มีสารไฟบริโนเจน (fibrinogen) อยู่ด้วย

2.6.2.3 แหล่งที่พบและการเกิดโรค

เชื้อ *S. aureus* จะมีชีวิตอยู่ในอากาศ ฝุ่นละออง ขยะมูลฝอย น้ำอาหาร หรืออาหารบรรจุเสร็จสภาพแวดล้อมภายนอกมนุษย์และสัตว์ ซึ่งมนุษย์และสัตว์นั้นเป็นแหล่งปฐมภูมิของเชื้อชนิดนี้ โดยจะพบบอยู่ตามทางเดินหายใจ ลำคอ เส้นผมและผิวหนัง อาจพบเชื้อชนิดนี้ 60-80% ในผู้ที่สัมผัสโดยตรงกับผู้ป่วยหรือผู้ที่สัมผัสกับสภาพแวดล้อมภายนอกนั้นก็เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือ การเก็บอาหารไว้ในอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม เป็นผลให้อาหารมีการปนเปื้อนอยู่แล้ว มีการเพิ่มของเชื้อและสร้างสารพิษอย่างรวดเร็ว อาการของโรคสมารถบ่งชี้ได้ว่าติดเชื้อ *S. aureus* นั้นจะแสดงให้เห็นอย่างรวดเร็ว อาการที่พบทั่วไปคือ หลังจากรับประทานอาหารปนเปื้อนประมาณ 2-4 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน วิงเวียน เป็นตะคิวในช่องท้อง และอ่อนเพลียในผู้ป่วยบางรายอาจมีมีอาการอื่นแทรกซ้อน เช่น ภาวะขาดน้ำอย่างรุนแรง ปวดหัว เป็นตะคิวที่กล้ามเนื้อและการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตเป็นระยะๆ การป้องกันสามารถทำได้โดยการอบรมผู้ประกอบอาหารมีความรู้ และเห็นถึงความสำคัญของการรักษาความสะอาดในขณะปรุงอาหารเพื่อเป็นการลดการปนเปื้อนของเชื้อ ส่วนในการบริโภคนั้นให้รับประทานอาหารที่ปรุงสุกใหม่ๆ หรือนำอาหารที่ปรุงสุกแล้วไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำเพียงพออย่างรวดเร็วเพื่อป้องการเจริญของเชื้อ หากยังไม่รับประทานในทันทีให้อุ่นอาหารให้ร้อนก่อนรับประทานทุกครั้ง

2.6.3 เชื้อ *Bacillus* spp.

2.6.3.1 ลักษณะทั่วไปและความสำคัญของ *Bacillus* spp.

Bacillus spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) รูปร่างเป็นท่อนทรงกระบอก (rod-shaped) อาจเป็นท่อนเดียวหรือต่อกันเป็นสาย มีขนาด 0.3-2.2 x 9.7-1.2 ไมโครเมตร ต้องการออกซิเจนในการหายบางครั้งสามารถเจริญได้ในที่ไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (endospore forming) 1 เซลล์ ต่อ 1 สปอร์ ทนทานต่อ

สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เจริญได้ในอาหารหลายชนิดเติมโตดีในอุณหภูมิปกติและ pH เป็นกลาง สามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิด เช่น protease และ amylase เป็นต้น เคลื่อนที่ได้ด้วย peritrichous flagella การศึกษาลำดับ DNA base (DNA sequence) ในแบคทีเรียสกุล *Bacillus* มีความแตกต่างกันอย่างกกันอย่างมาก เปอร์เซ็นต์ G+C content มีความแปรปรวนตั้งแต่ 33 เปอร์เซ็นต์ ใน *B. anthracis* จนถึง 69 เปอร์เซ็นต์ ใน *B. thermocatenulatus* ซึ่งสูงกว่าความแปรปรวนของลักษณะภายในสกุล ปกติความแปรปรวนของลักษณะในสกุลไม่ควรเกิน 15 เปอร์เซ็นต์ (Priest, 1993 อ้างถึงใน Rosovitz et al., 1998)

2.6.3.2 ลักษณะและคุณสมบัติของ *Bacillus* spp.

Bacillus spp. มีความหลากหลายทางลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยากว้าง ลักษณะโคโลนีความแปรปรวนมากขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม คุณภาพ และปริมาณของอาหารเลี้ยง อายุโคโลนี และจำนวนโคโลนีต่อจานอาหารที่เลี้ยงมีผลต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี ดังนั้นจึงเป็นการยากในการแยกชนิดด้วยลักษณะโคโลนี อย่างไรก็ตามในสภาพแวดล้อมเดียวกันลักษณะ โคโลนีสามารถใช้ในการจำแนกชนิดได้ (Rosovitz et al.1998) เช่นเมื่อเลี้ยงในอาหาร casein agar เชื้อ *B. megaterium* ให้โคโลนีมีสีเหลือง เชื้อ *B. firmus* ให้โคโลนีสีชมพู เชื้อ *B. licheniformis* ให้โคโลนีสีแดงถึงน้ำตาล เชื้อ *B. pumilus* ให้โคโลนีสีหลืองอ่อน เชื้อ *B. sphaericus* ให้โคโลนีสีชมพู และเชื้อ *B. subtilis* ให้โคโลนีสีชมพู เหลือง ส้ม หรือน้ำตาล ในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรต เชื้อ *B. subtilis* ให้โคโลนีสีน้ำเงินถึงดำ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร tyrosine agar เชื้อ *B. megaterium* และ *B. subtilis var. niger* ให้โคโลนีมีสีดำ เป็นต้น

แบคทีเรียสกุล *Bacillus* สร้างสปอร์ภายในเซลล์เมื่ออาหารมีจำกัดเซลล์เข้าระยะ stationary phase และอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ทำให้สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น ความร้อนแสง UV และสารเคมีต่างๆ บางเซลล์อาจมีแวคิวโอลบางชนิดอาจพบผลึกโปรตีน เช่น *B. thuringiennsis* (Rosovitz et al., 1998) รูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์และตำแหน่งการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ สามารถจำแนกแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ได้เป็น 3 กลุ่ม (สุรางค์, 2538)

1) กลุ่มที่ 1 เซลล์ไม่โป่งพอง สปอร์เป็นรูปวงรีหรือรูปทรงกระบอก ตำแหน่งสปอร์อยู่ตรงกลาง หรือค่อนไปทางปลายเซลล์กลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ

กลุ่มที่ 1A : เซลล์มีขนาดใหญ่ กว้างมากกว่า 1 ไมโครเมตรภายในโปรโตพลาสจะมีแกรนูลที่ไม่ติดสีแกรม ทำให้เห็นเซลล์ไม่ติดสีแกรม ทำให้เห็นเซลล์ไม่ติดสีเป็นช่วงๆ ได้แก่ *B. megaterium, B. cereus, B. cereus* var. *mycoides, B. thuringiensis* และ *B. anthracis*

กลุ่มที่ 1B: ขนาดเซลล์กว้างน้อยกว่า 1 ไมโครเมตร เช่น *B. subtilis, B. pumilis, B. licheniformis, B. firmus และ B. coagullans* เป็นต้น

2) กลุ่มที่ 2 เซลล์โป่งพอง สปอร์มีลักษณะเป็นรูปไข่ตำแหน่งอยู่กลางหรือปลายเซลล์ ได้แก่ *B. circulanc, B. macerone, B. polymyxa, B. alvei, B. laterosporus, B. brevis, B. popiliae, B. larvae, B. stearothrmophilus* และ *B. lentimorbus*

3) กลุ่มที่ 3 สปอร์ทำให้เซลล์โป่งออก หรือบางครั้งไม่โป่ง สปอร์รูปร่างกลมตำแหน่งอยู่ ปลายหรือค่อนไปทางเซลล์ เช่น *B. sphaericus*

2.6.3.3 แหล่งที่พบและการก่อโรค

เชื้อ *B. cereus* สามารถพบได้ในอาหารทั่วไป ตัวอย่างเช่น เนื้อสัตว์ นม ผักล้วนทำให้เกิดอาการท้องร่วงจากอาหารเป็นพิษได้ การระบาดของอาหารที่ทำให้เกิดโรคโดยทั่วไป จะเกิดการผลิตจากข้าว และอาหารจำพวกแป้งอื่นๆ เช่น มันฝรั่ง ข้าว เส้นก๋วยเตี๋ยว และผลิตภัณฑ์เนยแข็งรวมทั้งอาหารปรุงแต่ง เช่น ซอส พุดดิ้ง ซุป ลูกชิ้น พาย และสลัด

อาการของโรค จะเหมือนกับอาการท้องร่วงที่เกิดจากการได้รับเชื้อ คือถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ มีอาการปวดเกร็งที่ช่องท้อง ซึ่งจะเกิดภายใน 6-15 ชั่วโมง หลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน อาจมีอาการคลื่นไส้พร้อมๆกับปวดท้อง แต่อาการอาเจียนเกิดขึ้นไม่บ่อยนัก อาการของโรคจะคงอยู่นานที่สุด 24 ชั่วโมง อาหารเป็นพิษชนิดนี้ทำให้เกิดอาการอาเจียนจะมีลักษณะจำเพาะ คือมีอาการคลื่นไส้ และอาเจียนภาคในเวลาในเวลา 0.5-6 ชั่วโมง หลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อน

การป้องกัน ทำได้โดยวิธีการเก็บอาหารที่ปรุงสุขแล้วไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7°C ประมาณ 4 – 6 °C และควรจะมีการอุ่นอาหารที่เก็บไว้ก่อนที่จะนำมารับประทานอยู่เสมอเพื่อป้องกันการงอกของสปอร์เชื้อชนิดนี้

2.7 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลชีพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.7.1 วิธี Agar well diffusion (Vaseeharan & Ramasammy,2003)

เป็นวิธีทดสอบที่กระทำโดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีแบคทีเรียทดสอบมาเทลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากที่อาหารเลี้ยงแข็งตัวให้ทำการเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยที่เจาะวุ้นปราศจากเชื้อ (sterile cork borer) เพื่อให้เกิดหลุมขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นให้นำเอาสารละลายของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต้องการทดสอบเติมลงในหลุมที่เจาะไว้นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปบ่นในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตบริเวณส่วนใสของการยับยั้งที่เกิดขึ้นรอบๆหลุม แม้ว่าวิธี ager well diffusion จะเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในการทดสอบความสามารถในการผลิตยับยั้งจุลลินทรีย์ ของแบคทีเรีย แต่วิธีการดังกล่าวก็มีข้อจำกัด คือขั้นตอนเจาะหลุมในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเป็นต้องอาศัยความชำนาญและประสบการณ์ของผู้ทำการทดลองเพราะอาจทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นได้

2.7.2 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญโตของเชื้อทดสอบ

สามารถที่จะทำได้ทั้งบนอาหารแข็ง และอาหารเหลว แต่นิยมทำในอาหารเหลวมากกว่า เพราะสามารถอ่านผลการทดลองโดยใช้เครื่องมือวัดความขุ่นได้ วิธีการทำคือ เจือจาง สารปฏิชีวนะที่ต้องการทดสอบให้มีความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้การเจือจางลำดับส่วนแบบ 2 เท่า (serial 2-fold dilution) จากนั้นเติมเชื่อทดสอบที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลวลงไปในปริมาตรที่เท่ากัน ในแต่ละหลอดทดลองที่มีปฏิชีวนะเจือจางอยู่แล้วนำไปบ่นนาม 18-24 ชั่วโมง ขณะเดียวกันให้นับจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ในการทดสอบ โดยวิธีการนับเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ (viable cell count) อ่านผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทดสอบ โดยสังเกตจากความขุ่นของหลอดทดลองที่มีความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะน้อยที่สุดที่ไม่มีความขุ่น ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะน้อยที่สุดที่ไม่มีความขุ่น ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ ณ จุดนั้น คือค่า MIC จากนั้นนำหลอดที่ไม่ขุ่นทั้งหมดไปทำการเพาะเชื้อ (streak plate) บนอาหารวุ้นแข็งด้วยห่วงถ่ายเชื้อมาตรฐานปริมาณ 0.01 ml นำไปบ่มนาม 18-24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น ค่า MBC คือค่าที่ให้ผลของการนับจำนวนเซลล์ไม่เกิน 0.01% ของจำนวนเซลล์เริ่มต้น (Collins et . 1995) นั่นคือ หากจำนวนเซลล์เริ่มต้นมีค่า $2.5x10^5$ CFU/ml จำนวนโคโลนีที่ได้จากการเพาะเชื้อต้องไม่เกิน 25 CFU/ml

2.8 รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Miyashita et al. (2012) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารหมักของไทย พบแบคทีเรียจำนวน 945 สายพันธุ์จากอาหารหมักทางเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ 114 ตัวอย่าง และระบุสายพันธุ์ด้วย 16rRNA gene sequences และคัดเลือก 410 สายพันธุ์ที่มีความต่างของลำดับเบส และแหล่งที่มาของอาหารหมักเพื่อศึกษาต่อไป โดยพบว่า จากการวิเคราะห์ด้วย 16S rRNA gene sequences สามารถแบ่งได้เป็น 6 จีนัส ได้แก่ *Aerococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Pediococcus, Tetragenococcus* และ *Weissella* มีเพียง 1 สายพันธุ์มีความคล้ายคลึงกับจีนัส *Aerococcus viridians* 100% มี 4 สายพันธุ์ที่มีความคล้ายคลึง *Tetragenococcus halophilus* 99.9% และจากการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) ในตัวอย่างอาหารหมักอยู่ในช่วง 0-50% โดยตัวอย่างอาหารประเภทพืชหมักพบแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus fermentum* เป็นหลัก มีความเข้มข้น NaCl ต่ำกว่า 6% และมีระดับ pH อยู่ในช่วง 4.0-10.0 อย่างไรก็ตามจากตัวอย่างอาหารหมักจากพืชมากกว่าครึ่งพบว่ามีระดับความเข้มข้นของ NaCl ต่ำ

ปาลิตา และคณะ (2556) ศึกษาผักกาดเขียวปลีดอง เป็นระยะเวลา 12 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียแลคติกจากการหมักแบบธรรมชาติหรือแบบดั้งเดิม พบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 2.85- 8.76 log CFU/g เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบ Back-slopping จำนวนแบคทีเรีย

กรดแลคติก อยู่ในช่วง 4.14 - 8.21 log CFU/g และ การใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก อยู่ในช่วง 7.48 - 8.76 log CFU/g

บุษกร อุตรภิชาติ (2548) ได้กล่าวว่าโพรไบโอติกคือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตมีประโยชน์เสริมเข้าไปจากภายนอกร่างกาย ในปริมาณที่เพียงพอ สามารถทำให้เกิดผลดีต่อร่างกาย ซึ่งอาจช่วยป้องกันหรือรักษาโรคต่างๆที่เกิดขึ้น เช่น ป้องกันและลดการเกิดโรคมะเร็ง รักษาโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่องค์การอนามัยโลกให้การรับรองว่าเป็นโพรไบโอติกที่มีความปลอดภัย ได้แก่ *Lactobacillus* sp. และ *Bifidobacterium* sp. ซึ่งอาศัยในระบบทางเดินอาหารที่มีอาหารของจุลินทรีย์ดังกล่าว

มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา YALA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 กลุ่มตัวอย่าง

3.1.1 ผักดอง ได้แก่ ลูกเนียง ผักเสี้ยนดอง ขมิ้นขาวดอง

3.1.2 ผลไม้ดอง ได้แก่ กระท้อนดอง ตะขบดอง ตะลิงปลิงดอง

โดยทำการเก็บตัวอย่างจากจากตลาดนัด อำเภอยะรัง จังหวัดปัตตานี และตลาดสด อำเภอเมือง จังหวัดยะลา

3.2 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.2.1.1 Man Rogosa and Sharp (MRS) agar (Difco, USA)

3.2.1.2 Nutrient broth (NB) (Difco, USA)

3.2.1.3 Mueller Hinton agar (MHA) (Difco, USA)

3.2.1.4 Plat Count agar (PCA) (Difco, USA)

3.2.1.5 โซเดียมคลอไรด์

3.2.1.6 ชุดย้อมสีแกรม

3.2.1.7 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

3.2.1.8 Chloramphenical

3.2.1.9 Bromocresol purple

3.2.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.2.2.1 ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

3.2.2.2 จานเพาะเชื้อ (Plate)

3.2.2.3 ตะแกรง (Test tube rack)

3.2.2.4 ปากคีบ (Forceps)

3.2.2.5 ไมโครปิเปต (Micropipette)

3.2.2.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.2.2.7 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

3.2.2.8 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, WTB binder)

3.2.2.9 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow)

3.2.2.10 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

3.2.2.11 เครื่องเหวี่ยง

3.2.2.12 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope compound)

3.3 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการ

3.3.1 การวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด(สุมาลี, 2540)

3.3.3.1 ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ถุงที่ปราศจากเชื้อ ตีให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วใส่ใน 0.85% NaCl ปริมาณ 225 มิลลิลิตร จะได้ตัวอย่างที่ 10^{-1}

3.3.3.2 เขย่าให้ตัวอย่างผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างจาก 10^{-1} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่สองที่มี 0.85% NaCl ดูดขึ้นดูดลงให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวกันแล้วเจือจางต่อไปที่ 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}

3.3.3.3 ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างอาหารแต่ละหลอดที่เจือจางแล้วใส่จานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร

3.3.3.4 เทอาหาร Pate Count Agar (PCA) และอาหาร Man Rogosa and Sharp (MRS) agar ที่เติม bromocresol puple 0.004 เปอร์เซ็นต์ ลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างโดยใส่จานละ 20 มิลลิลิตร หมุนจานเพาะเชื้อให้ผสมด้วยกันทิ้งไว้จนอาหารแข็ง แล้วบ่มที่ 37 C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.3.3.5 ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด ในจานเพาะเชื้อที่ 25-250 โคโลนี รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัม

3.3.2 การคัดแยกแบคทีเรียแลคติก (สุพรรณิการ์, 2548)

เลือกโคโลนีที่เจริญใน อาหาร Man Rogosa and Sharp (MRS) agar ที่เติม bromocresol 0.004 เปอร์เซ็นต์ และที่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ จากสีม่วงเป็นสีเหลือง จากข้อ 3.3.1 นำไป Streak ลงใน MRS agar เพื่อให้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ โดยเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ เลี้ยงไว้บนอาหาร MRS agar บ่มที่ 37 C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และศึกษาลักษณะสัณฐานและการติดสีแกรม และสร้างเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นของการแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

3.3.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ โดยวิธี Agar well diffusion (Vaseeharan & Ramasammy,2003)

3.3.3.1 การเตรียมแบคทีเรียแลคติก

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหาร MRS broth ปริมาตร 3 มล. บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วปรับ Mcfarland standard No. 03

3.3.3.2 การเตรียมแบคทีเรียสำหรับทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *Bacillus* sp. ที่ผ่านการ Subculture 2 ครั้ง เพื่อให้เชื้อ active มาเลี้ยงใน Nutrient broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วปรับให้ได้เชื้อเท่ากับ 10^6 โดยใช้ Mcfarland standard No. 05

3.3.3.3 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลคติกและคำนวณร้อยละอัตราส่วนการยับยั้ง

ใช้สำลีพันปลายไม้ (cotton swab) ที่ปราศจากเชื้อ จุ่มเชื้อแบคทีเรียทดสอบจากข้อ 3.3.3.2 มาเกลี่ยบนอาหาร Muller hinton agar (MHA) ให้ทั่วจาน แล้วเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ดูดแบคทีเรียแลคติกที่เตรียมไว้ใส่ในหลุม หลุมละ 80 ไมโครลิตร บ่มที่ 35 C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้อาหาร Nutrient Broth เป็นตัวควบคุมแบบลบ (Negative control) และใช้ดิสก์ยาปฏิชีวนะ Chloramphenicol disk ขนาด 30 ไมโครกรัม เป็นชุดควบคุมแบบบวก (Positive control) คำนวณการยับยั้งเป็นค่า % Inhibition ratio (IR) เทียบกับ Positive control จากสูตร

$$\%IR = \frac{(\text{ø โซนใสของเชื้อทดสอบ} - \text{ø หลุม}) \times 100}{\text{Ø โซนใสของยาปฏิชีวนะ- Ø ของดิสก์แผ่นดิสก์}}$$

3.3.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

นำเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเพาะเชื้อแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น 24 ชั่วโมง นำมาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีดังนี้

3.3.4.1 การตรวจการติดสีแกรม และรูปร่าง

เขี่ยเชื้อที่บริสุทธิ์ลงบนแผ่นสไลด์ ย้อมสีด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที เทสีทิ้งพร้อมทั้งหยดสารละลายไอโอดีนนาน 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้งพร้อมทั้งหยดสารละลายแอลกอฮอล์ ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงย้อมด้วยสารละลาย safranin O

เป็นเวลา 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจสอบลักษณะเซลล์การจัดเรียงตัวด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.2.4.2 การทดสอบคะตะเลส (catalase)

นำเชื้อที่บริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง มาเขี่ยบนกระดาษกรองที่หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ร้อยละ 3 ถ้าพบโคโลนีเกิดฟองอากาศแสดงว่าแบคทีเรียนั้นให้ผลบวก

3.2.4.3 การตรวจสอบการสร้างก๊าซ

เขี่ยเชื้อที่บริสุทธิ์ในอาหารเพาะเชื้อเหลว MRS ใส่หลอดดักก๊าซ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง แบคทีเรียกลุ่ม heterofermentative จะพบก๊าซในหลอดดักก๊าซ ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม homofermentative จะไม่พบก๊าซในหลอดดักก๊าซ

3.2.4.4 การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเพาะเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส ทดสอบการเจริญโดยดูจากความขุ่น เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใน 7 วัน

3.2.4.5 การทดสอบความทนเกลือ

เขี่ยชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเพาะเชื้อเหลว MRS เติมโซเดียมคลอไรด์ 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสตรวจสอบการเจริญโดยดูความขุ่นเมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายใน 7 วัน

3.2.5 การหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) โดยวิธี Spot-on-lawn method (ดัดแปลงจาก Ennahar et al., 2001)

3.2.5.1 การเตรียมแบคทีเรียแลคติก

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหาร MRS broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมงแล้วปรับ Mcfarland standard No. 03

3.2.5.2 การเตรียมแบคทีเรียสำหรับทดสอบ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *Bacillus* sp. ที่ผ่านการ Subculture 2 ครั้ง เพื่อให้เชื้อ active มาเลี้ยงใน Nutrient broth (NB) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วปรับให้ได้เชื้อเท่ากับ 10^6 โดยใช้ Mcfarland standard No. 05

3.2.5.3 การทดสอบความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

นำแบคทีเรียแลคติกที่เลี้ยง 18 ชม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วปรับค่า pH ของสารละลายเท่ากับ 6 แล้วไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 5 นาที รอให้เย็นส่วนใสดูด 50

ไมโครลิตร แล้วทำการเจือจางจนหลอดสุดท้าย ในลักษณะการเจือจาง 2 เท่า แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายที่เจือจางแล้ว 10 ไมโครลิตรหยดบนผิวหน้าอาหาร MRS agar ที่เตรียมไว้ รอจนสารละลายแห้ง เททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีวุ้น 0.7 - 1% และเชื้อทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่หลอมตัวรวมกันทิ้งให้อาหารเซตตัวแล้วไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม คำนวณหาค่ากิจกรรมการยับยั้งจากจานเพาะเชื้อตัวอย่างจากสูตร

$$\text{ค่ากิจกรรมยับยั้ง (U/ml)} = \frac{\text{ลำดับความเจือจางสูงสุดที่เกิดการยับยั้ง}}{\text{ปริมาตรของสารทดสอบ}} \times 1000$$

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการนับจำนวนจุลินทรีย์และแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด

4.1.1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดจากตัวอย่างผักและผลไม้ดองท้องถิ่น

นำตัวอย่างผักและผลไม้ดองท้องถิ่นได้แก่ ลูกเนียงดอง ผักเสี้ยนดอง ขมิ้นขาวดอง ตะลิงปลิงดอง ลูกตะขบดองและกระท้อนดอง จากตลาดนัด อำเภอยะรัง จังหวัดปัตตานี และตลาดสด อำเภอเมือง จังหวัดยะลา มาตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) โดยวิธี Pour plate ในอาหาร PCA (Plate count agar) พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ในผักและผลไม้ดองท้องถิ่น อยู่ระหว่าง 0.0055 - 4.8×10^{9} CFU/g และจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS ที่การผสม Bromocresol purple 0.004% พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ในผักและผลไม้ดองท้องถิ่นแต่ละชนิดอยู่ระหว่าง 0.9 - 7×10^{2} CFU/g ดังตาราง 4.1 จากการทดลองดังกล่าวมีความสอดคล้องกับรายงานของ ภณิดา เกื้อสุวรรณ (2556) ที่กล่าวไว้ว่า ผักดองมีระยะการหมัก 2-15 วัน จุลินทรีย์สามารถอยู่รอดในผักดอง

ตาราง 4.1 ปริมาณจุลินทรีย์และแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในผัก ผลไม้ดองท้องถิ่น

ตัวอย่าง	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/g)	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด ($\times10^{2}$ CFU/g)
ลูกเนียงดอง	$4.8\times10^{9}\pm0.3$	2.8± 0.5
ผักเสี้ยนดอง	$0.6\times10^{9}\pm1.1$	7.0± 3.1
ขมิ้นขาวดอง	$5.5\times10^{6}\pm4.6$	2.6± 2.7
ตะลิงปลิงดอง	$6.5\times10^{7}\pm2.9$	0.9± 1.4
ลูกตะขบดอง	$4.6\times10^{7}\pm1.6$	1.3± 0.1
กระท้อนดอง	$5.9\times10^{7}\pm0.1$	1.9± 0.7

4.1.2 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกตัวอย่างจากผักและผลไม้ดองท้องถิ่น

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างผักและผลไม้ดองท้องถิ่น พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติตรงตามคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลคติก คือจากโคโลนีที่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์บนอาหาร MRS agar จากสีม่วง เป็นสีเหลือง เซลล์ติดแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส จากผัก และผลไม้ดองท้องถิ่นทั้งหมด 19 ไอโซเลต ได้แก่ ลูกเนียงดอง 6 ไอโซเลต ได้แก่ N1 N2 N3 N4 N5 และN6 ผักเสี้ยนดอง 6 ไอโซเลต ได้แก่ N1, N2, N3, N4, N5 และN6 ผักเสี้ยนดอง 6 ไอโซเลต ได้แก่ S1, S2, S3, S4, S5 และS6 ขมิ้นขาวดอง 1 ไอโซเลต ได้แก่ K ลูกตะขบดอง 3 ไอโซเลต ได้แก่ TA1 TA2 และ TA3 กระท้อนดอง 1 ไอโซเลต ได้แก่ T และตะลิงปลิงดอง 2 ไอโซเลต ได้แก่ P1 และP2 (ตาราง 4.2)

ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของภณิดา เกื้อสุวรรณ (2556) ที่ได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผักและผลไม้ดองชนิดต่างๆ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลต โดยคัดแยกได้จากผักดอง 12 ไอโซเลตและผลไม้ดอง 3 ไอโซเลต ที่มีทั้งรูปร่างกลมและรูปร่างแท่ง และ สิรินดาและคณะ, 2554 ได้กล่าวไว้ว่า แบคทีเรียกรดแลคติก จะมักย้อมติดสีแกรมบวก เซลล์จะมีรูปร่างทั้งแบบกลม (cocci) และแบบท่อน (rods) ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีการเคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส มีการจัดเรียงตัวเป็นสายโซ่ เป็นคู่ และเป็นกลุ่ม

ตาราง 4.2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักและผลไม้ดองท้องถิ่น

ชนิดของตัวอย่าง	ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี			การย้อมสีแกรม	รูปร่างของเซลล์	คะตะเลส
		ขนาด (มม.)	ริมขอบ	สี			
ลูกเนียงดอง	N1	0.5	กลม นูนทึบแสง	ขาวขุ่นออกเหลือง	บวก	กลม	ลบ
	N2,N3	2	กลม นูน ทึบแสง	ขาวขุ่นออกเหลือง	บวก	กลม	ลบ
	N4	1.5	กลม นูน ทึบแสง	ขาวขุ่น	บวก	ท่อน	ลบ
	N5	1	กลม นูน ทึบแสง	ขาวขุ่น	บวก	ท่อน	ลบ
	N6	1	กลม นูน ทึบแสง	ขาวขุ่นออกเหลือง	บวก	กลม	ลบ

ชนิดของตัวอย่าง	ไอโซเลต	ลักษณะโคโลนี			การย้อมสีแกรม	รูปร่างของเซลล์	คะตะเลส
		ขนาด (มม.)	ริมขอบ	สี			
ผักเสี้ยนดอง	S1, S4	1	กลม นูน ทึบแสง	เหลืองขุ่น	บวก	ท่อน	ลบ
	S2	1.5	กลม นูน ทึบแสง	ขาวขุ่นออกเหลือง	บวก	ท่อน	ลบ
	S3	0.5	กลม นูน ทึบแสง	เหลืองขุ่น	บวก	ท่อน	ลบ
	S5	1	กลม นูน ทึบแสง	ขาวขุ่นออกเหลืองจาง	บวก	กลม	ลบ
	S6	2	กลม นูน ทึบแสง	ขาวขุ่นออกเหลืองจาง	บวก	กลม	ลบ
ขมิ้นขาวดอง	K	0.5	กลม นูน ทึบแสง	ขาวขุ่นออกครีม	บวก	กลม	ลบ
ลูกตะขบดอง	TA1	1	กลม นูน ทึบแสง	ขาวขุ่น	บวก	กลม	ลบ
	TA2,TA3	2	กลม นูน ทึบแสง	ขาวขุ่นออกครีม	บวก	กลม	ลบ
กระท้อนดอง	T	1	กลม นูน ทึบแสง	ขาวขุ่น	บวก	กลมรี	ลบ
ตะลิงปลิงดอง	P1	0.5	กลม นูน ทึบแสง	ขาวขุ่นออกครีม	บวก	กลม	ลบ
	P2	2	กลม นูน ทึบแสง	ขาวขุ่นออกครีม	บวก	กลมรี	ลบ

4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค

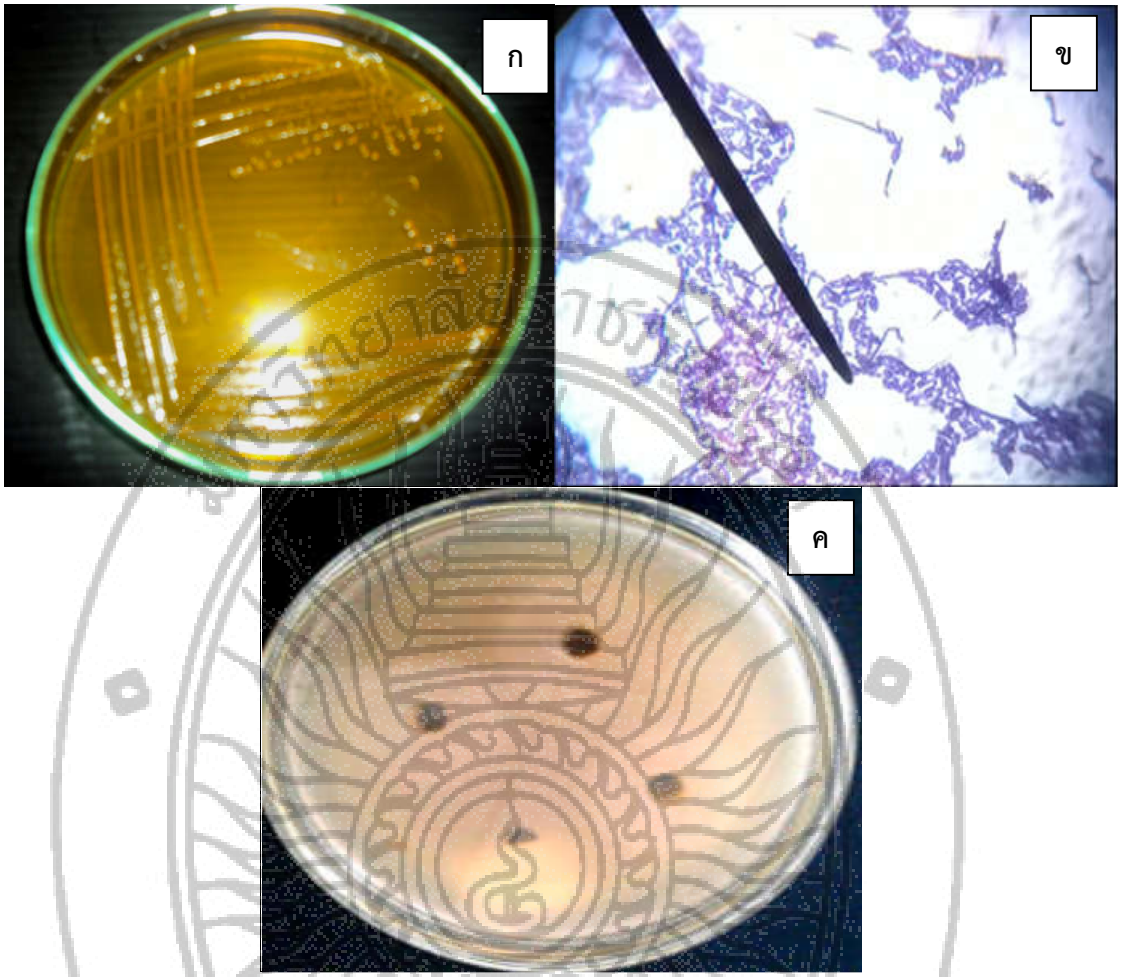
จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ 19 ไอโซเลต สามารถยับยั้งได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* มีทั้งหมด 4 ไอโซเลต ได้แก่ S2, TA1, TA2, TA3, และแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มีทั้งหมด 9 ได้แก่ S1, S2, TA1, TA2, TA3 N4, N5, T และ P2 ส่วนเชื้อ *Bacillus* sp. ไม่มีไอโซเลตใดสามารถยับยั้งได้เลย แสดงไว้ในตาราง 4.3

เมื่อเปรียบเทียบขนาดวงของวงใสพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้มากที่สุด โดยดูจากความกว้างของวงใส กว้างมากสูงสุดคือขนาด 20.87±0.2 มม. ซึ่งสร้างโดยเชื้อไอโซเลต S1 (ดังภาพที่ 4.1) รองลงมามีขนาดวงของวงใสคือ 20.10 ±1.1 มม. โดยไอโซเลต N5 (ดังภาพที่ 4.2) และอันดับที่สามมีขนาดวงของวงใสคือ 16.89 ±2.1 มม. โดยเชื้อไอโซเลต T (ดังภาพที่ 4.3)

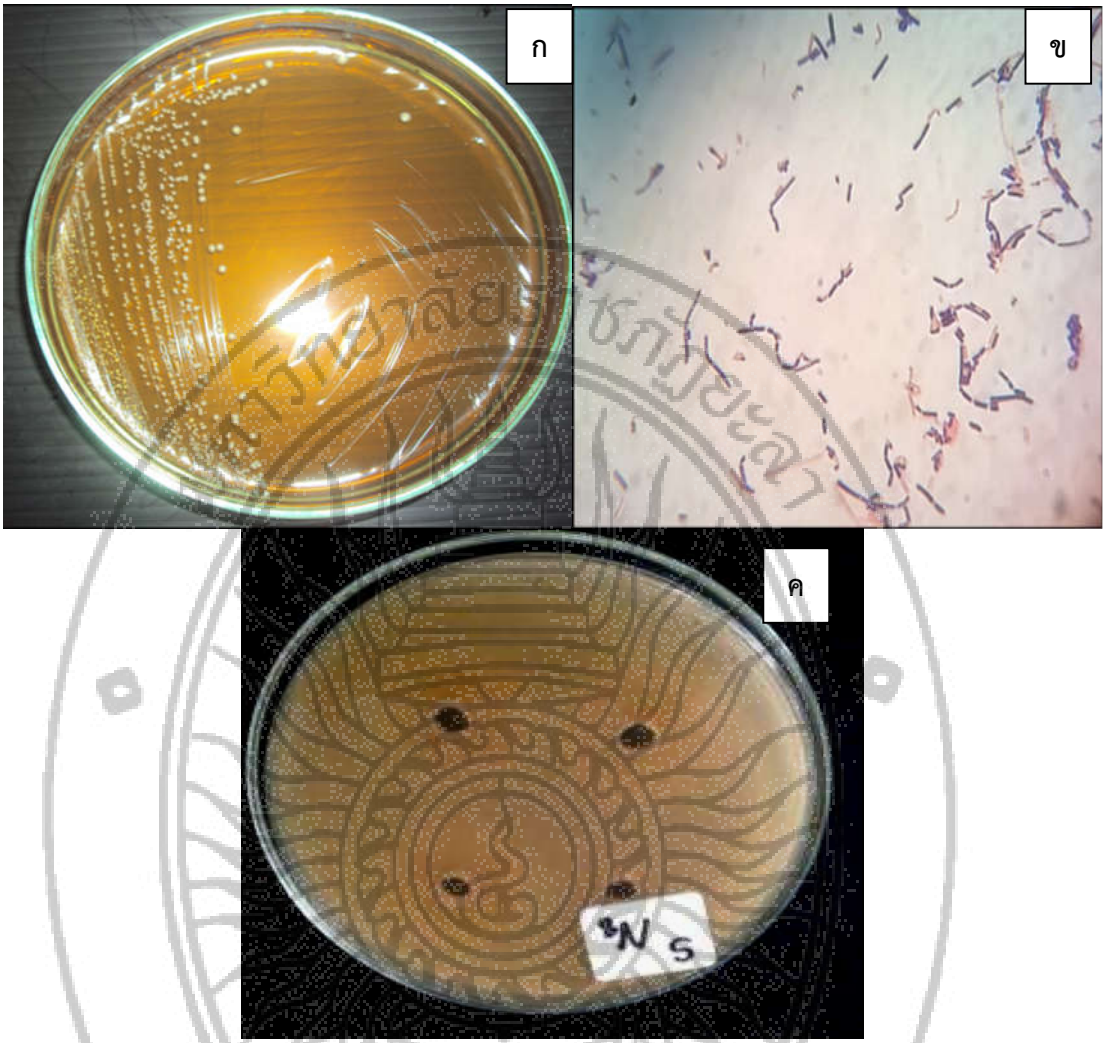
ตาราง 4.3 ขนาดวงใสการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยแบคทีเรียกรดแลคติก

ไอโซเลต	**ขนาดวงใส (mm)**		
	E. coli	***S. aureus***	***Bacillus* sp.**
N4	-	15.5 ± 0.3	-
N5	-	20.1 ± 1.1	-
P2	-	14.5 ± 0.5	-
S1	-	20.9± 0.2	
S2	9.00 ± 1.2	10.2 ± 2.3	-
TA1	10.1 ± 1.4	9.9 ± 3.1	-
TA2	10.0 ± 1.8	9.9± 1.5	-
TA3	9.2 ± 0.9	10.9 ± 0.8	-
T	-	16.9 ± 2.1	-
Chloramphinicol (positive control)	29.8 ± 2.1	22.1 ± 1.9	22.7 ± 2.7

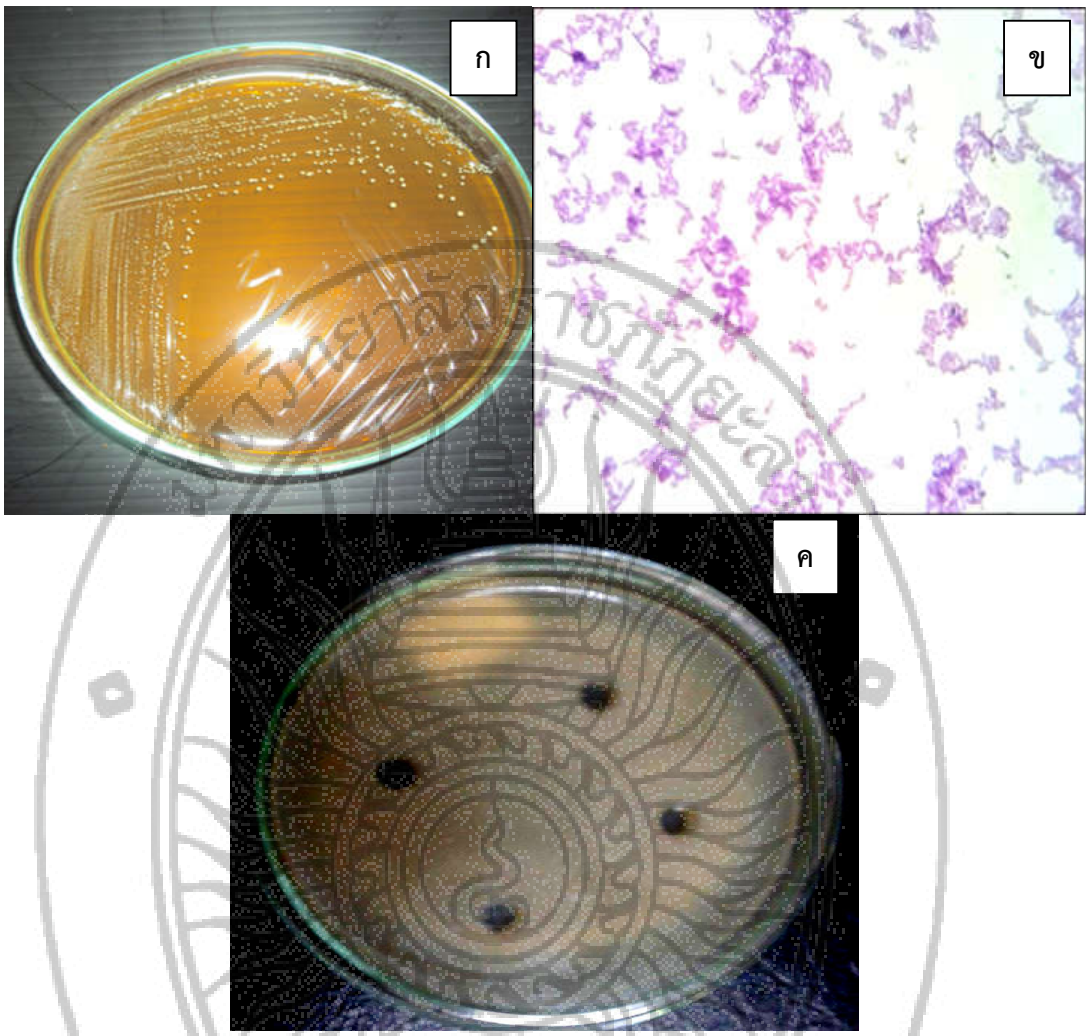
หมายเหตุ : N หมายถึง แยกได้จากลูกเนียงดอง P หมายถึง แยกได้จากตะลิงปลิงดอง S หมายถึง แยกได้จากผักเสี้ยนดอง
TA หมายถึง แยกได้จากลูกตะขบดอง T หมายถึง แยกได้จากกระท้อนดอง



ภาพที่ 4.1 ไอโซเลต S1 คัดแยกจากผักเสี้ยนดอง
ก. ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต S1 ที่เจริญบนอาหาร MRS agar จากผักเสี้ยนดอง
ข. ภาพใต้กล้องและการเรียงตัวของ S1 กำลังขยาย 1,000 เท่า
ค. การยับยั้งของ S1 ต่อเชื้อ *S. aureus*



ภาพที่ 4.2 ไอโซเลต N5 คัดแยกจากลูกเนียงดอง
ก. ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต N5 ที่เจริญบนอาหาร MRS agar จากลูกเนียงดอง
ข. ภาพใต้กล้องและการเรียงตัวของ N5 กำลังขยาย 1,000 เท่า
ค. การยับยั้งของ N5 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus*



ภาพที่ 4.3 ไอโซเลต T คัดแยกจากกระท้อนดอง
ก. ลักษณะโคโลนีของไอโซเลต T ที่เจริญบนอาหาร MRS agar จากกระท้อนดอง
ข. ภาพใต้กล้องและการเรียงตัวของ T กำลังขยาย 1,000 เท่า
ค. การยับยั้งของ T ต่อเชื้อ *S. aureus*

จากการคำนวณการยับยั้งเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของอัตราส่วนการยับยั้ง (% Inhibition ratio; %IR) เทียบกับ Positive control จากสูตรของ Kwantrirat, 1999 พบว่ามี ไอโซเลต S1 มีค่าเปอร์เซนต์ของอัตราส่วนการยับยั้งสูงสุดที่ 85.23% รองลงมาคือไอโซเลต N5 มีค่าเปอร์เซนต์ของอัตราส่วนการยับยั้งที่ 81.46% อันดับที่สามคือไอโซเลต T มีค่าเปอร์เซนต์ของอัตราส่วนการยับยั้งที่ 81.46% ซึ่งเชื้อทั้งสามอันดับนั้นสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ดังตาราง 4.4

ตาราง 4.4 การยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* โดยแบคทีเรียกรดแลคติก

ไอโซเลต / เชื้อก่อโรค	% IR (%)								
	N4	N5	P2	S1	S2	TA1	TA2	TA3	T
E. coli	-	-	-	-	4.33	8.88	8.79	5.11	-
S. aureus	46.58	**81.46**	43.25	**85.23**	13.25	13.11	13.18	19.21	**65.49**

4.3 การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับจีนัส

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 9 ไอโซเลต จัดจำแนกชนิดตามวิธีการของ (Axelsson, 1998) พบว่าได้ผลดังตาราง 4.5 นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับแบคทีเรียกรดแลตติกสกุลต่างๆ พบว่า ไอโซเลต S1, S2, N4 และN5 จำแนกอยู่ในสกุล ***Lactobacillus*** ไอโซเลต TA1, TA2, TA3 จำแนกอยู่ในสกุล *Enterococus* ไอโซเลต P2 และ T จำแนกอยู่ในสกุล *Lactococcus* ซึ่งสอดคล้องกับการายงานของ กนก และนงพนา, 2555 ที่รายงานว่า การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกระดับสปีชีส์ที่คัดแยกได้จากผักและผลไม้ดอง ซึ่งศึกษาทางสัณฐานวิทยาและทดสอบทางชีวเคมี เป็นไปได้ว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีเซลล์รูปร่างท่อนสั้นซึ่งอาจจัดว่าเป็นจีนัส *Lactobacillus* พบทั้งพวก Homofermentative และ Hererofermentative สามารถเจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจต่างกันกับ *Lb. plantarum* และ *Lb. sake* ที่ไม่สามารถเจริญได้ หรืออาจเจริญได้บ้างที่อุณหภูมิดังกล่าว

ตาราง 4.5 แสดงลักษณะสำคัญของแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับจีนัส

คุณสมบัติ	*Lactobacillus*				*Enterococcus*			*Lactococcus*	
ไอโซเลต	**S1**	**S2**	**N4**	**N5**	**TA1**	**TA2**	**TA3**	**T**	**P2**
รูปร่าง	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	กลม	กลม	กลม	กลมรี	กลมรี
การสร้าง CO_2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
เจริญที่อุณหภูมิ 10 $^{\circ}C$	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เจริญที่อุณหภูมิ 45 $^{\circ}C$	-	+	+	-	+	+	+	+	-
เจริญที่ 6.5 % NaCl	+	-	-	+	+	+	+	-	-
เจริญที่ 18 % NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง มีการเจริญ

\- หมายถึง ไม่มีการเจริญ

4.4 การทดสอบการยับยั้งต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentration MIC)

จากการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งต่ำสุดการเจริญของเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ด้วยสารสารละลายแบคทีเรียกรดแลคติก โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงแล้วแยกส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธี Spot-on-lawn method พบว่า S1 ซึ่งแยกจากผักเสี้ยนดองสามารถยับยั้ง *S. aureus* มีลำดับวงใสเท่ากับ 200 u/ml แสดงว่า S1 เป็นแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน

ภาพที่ 4.4 การยับยั้งต่ำสุด S1 ต่อเชื้อ *S.aureus* จากผักเสี้ยนดอง

YALA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป และอภิปรายผล

ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผักเสี้ยนดอง ขมิ้นขาวดอง ลูกเนียงดอง ตะลิงปลิงดอง กระท้อนดอง และตะขบดอง พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ในผักและผลไม้ดองท้องถิ่นอยู่ระหว่าง 4.65×10^{7} - 4.8×10^{9} CFU/g และจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS ที่การผสม Bromocresol purple 0.004% พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ในผักและผลไม้ดองท้องถิ่นแต่ละชนิดอยู่ระหว่าง 0.9-7×10^{2} CFU/g สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 19 ไอโซเลต จากผักเสี้ยนดอง 6 ไอโซเลต, ขมิ้นขาวดอง 1 ไอโซเลต , ลูกเนียงดอง 6 ไอโซเลต , ตะลิงปลิงดอง 2 ไอโซเลต , กระท้อนดอง 1 ไอโซเลต และจากตะขบดอง 3 ไอโซเลต สอดคล้องกับรายงานวิจัยของปาลิตา และคณะ, 2556 ศึกษาผักกาดเขียวปลีดอง เป็นระยะเวลา 12 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียแลคติกจากการหมักแบบธรรมชาติหรือแบบดั้งเดิม พบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก อยุในช่วง 2.85-8.76 log CFU/g เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบ Back-slopping จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก อยู่ในช่วง 4.14 - 8.21 log CFU/g และ การใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก อยู่ในช่วง 7.48 - 8.76 log CFU/g แสดงว่าโดยธรรมชาติแล้วการผลิตผักหรือผลไม้ดองมักเกิดแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่แล้ว จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ ด้าน เช่น รูปแบบการหมัก หรือชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก ระยะเวลาในการหมัก ล้วนเป็นปัจจัยสำคัญทั้งสิ้น

เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli, S. aureus* และ *Bacillus* sp. พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* มีทั้งหมด 4 ไอโซเลต ได้แก่ S2, TA1, TA2 และ TA3 แบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มีทั้งหมด 9 ได้แก่ S1, S2, TA1, TA2, TA3 N4, N5, T และ P2 ส่วน *Bacillus* sp. ไม่เกิดการยับยั้ง เมื่อเปรียบเทียบขนาดวงของวงใสพบว่า S1 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้มากที่สุด (20.87±0.2 มม.) คิดค่า %IR มีค่าเท่ากับ 85.23% รองลงมาคือ N5 (20.10 ±1.1 มม.) %IR มีค่าเท่ากับ 81.46% และอันดับที่สามคือ T (16.89 ± 2.1 มม.) %IR มีค่าเท่ากับ 65.49% เมื่อนำมาทดสอบทางชีวเคมีบางประการ พบว่า ไอโซเลต S1 และ N5 มีแนวโน้มว่าอยู่ในจีนัส *Lactobacillus* ซึ่งสอดคล้องกับการายงานของ กนก และนงพนา, 2555 ที่รายงานว่าการจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกระดับสปีชีส์ที่คัดแยกได้จากผักและผลไม้ดอง ซึ่งเมื่อศึกษาทางสัณฐานวิทยาและทดสอบทางชีวเคมี เป็นไปได้ว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีเซลล์รูปร่างท่อนสั้นซึ่งอาจจัดว่าเป็นจีนัส *Lactobacillus* ซึ่งมีทั้งกลุ่มที่จัดอยู่ใน Homofermentative และ Hererofermentative สามารถเจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจต่างกันกับ *Lb. plantarum* และ

Lb. sake ที่ไม่สามารถเจริญได้ หรืออาจเจริญได้บ้างที่อุณหภูมิดังกล่าว ส่วน ไอโซเลต T มีแนวโน้มว่าอยู่ในจีนัส *Lactococcus* เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งต่ำสุดด้วยวิธี Spot-on-lawn method พบว่า S1 ซึ่งแยกจากผักเสี้ยนดองสามารถยับยั้ง *S. aureus* ต่ำสุดเท่ากับ 200 U/ml ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ สุภาภรณ์ กล่าวไว้ในหนังสือพิมพ์ คม ชัด ลึก เมื่อวันที่ 30 สิงหาคม 2556 ว่า งานวิจัยเกี่ยวกับผักดองและภูมิปัญญาการใช้ผักดองของไทยและต่างชาติ โดยเฉพาะ 'ผักเสี้ยนดอง' การดองที่ใช้เวลาไม่นาน พอผักเริ่มมีรสเปรี้ยวพอดี ๆ ก็รับประทาน จะได้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ หรือโพรไบโอติกส์มาก การดองจึงเป็นความรู้พื้นบ้านในการถนอมสารอาหารได้เป็นอย่างดี ส่วนวิธีการดองผักเสี้ยนนั้น ในแต่ละท้องถิ่นต่างก็มีวิธีที่แตกต่าง และรายงานของอาจารย์วันชัย พันธ์ทวี ก็ได้กล่าวไว้ว่า ลูกเนียงดอง และผักเสี้ยนดอง ล้วนมีแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่ม *Lactobacillus* เช่น *Lb. Fermentum*, *Lb. brevis* และ *Lb. pentosus* แต่สายพันธุ์ที่พบในแต่ภาคของประเทศไทยก็แตกต่างกัน อาจเป็นเพราะวิธีการหมักหรือส่วนผสมของอาหารหมัก เช่น ผักเสี้ยนดอง เหมือนกันแต่วิธีการทำและส่วนผสมแตกต่าง เช่น ผักเสี้ยนดองสูตรปราจีนบุรี ส่วนประกอบ ผักเสี้ยน น้ำซาวข้าว เกลือ น้ำตาลทรายขาว ส่วน ผักเสี้ยนดอง สูตรภาคใต้ ผักเสี้ยน 2 - 3 กำมือ เกลือ 1 ช้อนโต๊ะ ข้าวสุก 2 - 3 ช้อนโต๊ะ หรือน้ำซาวข้าวพอท่วม และ ผักเสี้ยนดอง สูตรคุณอารีศิลป์ ปังเขี้ยว จ.อุบลราชธานี ส่วนประกอบ ยอดผักเสี้ยน เกลือ น้ำซาวข้าวเหนียว น้ำมะพร้าว มะเขือขื่น ดังนั้นอาจทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกมีความหลากหลายแตกต่างกัน และประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อก่อโรคมีผลที่แตกต่างกันไปด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. สามารถนำไปต่อยอดในการศึกษาคุณสมบัติโพรไบโอติกและการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการเพื่อยกระดับอาหารหมักพื้นบ้าน

2.สามารถนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ทดสอบประสิทธิภาพกับเชื้อก่อโรคชนิดอื่นๆ ได้ เช่น เชื้อ *Salmonella* spp.

บรรณานุกรม

กฤษณา ประภัสสรวัฒนา สาวิตรี วทัญญูไพศาล และจัทรพร ผลากรกุล. 2552. **การใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินเป็นหัวเชื้อในการทำไส้กรอกเปรี้ยว.** การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 47, 17-20 มีนาคม 2552.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กนก วงศ์รัฐปัญญา และนงพงา คุณจักร. 2555.**ความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียย่อยแป้งที่แยกได้จากอาหารหมักในประเทศไทยและการกระจายตัวของยีนที่ ควบคุมการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้ง ในแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum*.** การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 50, 31 มกราคม - 2 กุมภาพันธ์ 2555. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

คม ชัด ลึก. 2556. **ผักเสี้ยน ราชินีผักดอง ของผู้หญิง** ออนไลน์เมื่อ 30 กันยายน 2559 จากเว็บไซต์ http://www.komchadluek.net/news/detail/166938

จิราวรรณ เอี่ยมภาคีนิวัฒ์. 2527. **การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากกะทิผสมแป้งถั่วเหลืองปราศจากไขมันเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อโยเกิร์ต.**วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิตมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นวลจันทร์ พารักษา.2533 **สาระน่ารู้เกี่ยวกับโปรไอติก.** ว.สุกรศำนส์.16: หน้า 6

นุชจิรา ยะสง่า. (2551).**การคัดแยกและการตรวจคัดแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทริโอซินได้จากผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดอง.** มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.เชียงใหม่.

บุษกร อุตรภิชาติ. 2548. **มารู้จัก "แบคทีเรียกรดแลคติก" กันเถอะ.**วารสารวิทยาศาสตร์ทักษิณ ปีที่ 2 ฉบับที่ 2 หน้า 18-33

ประวัติ อังประภาพรชัย นัทธ์หทัย สงบพันธ์ และภัทราวุธ โสภา. 2550. **การแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักที่มีศักยภาพในการผลิต tetrametyl pyrazine.** วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย

ปาลิดา ตั้งอนุรัตน์ วัลย์ลิกา สมบัติมี และกฤติกา ศรีแดน.2556. **ผลของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อคุณภาพของการหมักผักกาดเขียวปลี.**ว. วิทย์. กษ. 44(2)(พิเศษ): หน้า 321-324

พิเชษฐ์ สุวรรณ์.2548. **การผลิตกรดแลคติกโดยเซลล์ตรึงแบคทีเรียกรดแลคติก.**ปริญญานิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา).เชียงใหม่:บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ภวัต สังขะวัฒนะ. 2544. **การพัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักคล้ายโยเกิร์ตโดยเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติก.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ภณิดา เกื้อสุวรรณ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล ดวงพร คันธโชติ. **2014. การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดอง.** Graduate Research Conference ,GRC Khon Kaen University. หน้า BMP2-10

วรายุทธ สุระนรากุล สัมภาษณ์ คุณสุข ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนกุลโสภณ. 2550. **คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก.**วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ศิริกัญญา ลิ้มประเสริฐ และพิมใจ เรือนนุช.(2548).**การศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งจุลชีพที่แบคทีเรียกรดแลกสร้างขึ้นเพื่อยับยั้งเชื้อ *Bacillus* sp.** รายงานการวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม

สุพรรณการ์ ศรีบัวทอง. 2547. **การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์และคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อขนมจีนแป้งหมัก** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง. 2548. **การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากข้าวหมักเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อขนมจีนแป้งหมัก.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีการ อาหาร.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพมหานครฯ:โรงพิมพ์: มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2549. **ตารางจุลชีววิทยาทางอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ กรุงเทพฯ, 436

สุมาลี เหลืองสกุล.(2540).**คู่มือปัฏิบัติการทางจุลชีววิทยาอาหาร.กรุงเทพ.**มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒประสานมิตร

สิรินดา ยุ่นฉลาด และกาญจนา นนทะเสน. 2554. **แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถใช้แทนสารกันบูดในผลิตภัณฑ์อาหาร.** วารสารศูนย์บริการวิชาการ ปีที่ 19 ฉบับที่1 มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อัจฉรา เพิ่ม. 2549 .**แบคทีเรียกรดแลคติก.** คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุษณีย์ อภิบาลแบ สมพร ประเสริฐส่งสกุล อภิชัย บัวชูก้าน และสมรักษ์ พันธ์ผล. 2556. **การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักที่มีความเข้มข้นเกลือสูง และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย.** บทความวิจัยในการประชุมหาดใหญ่วิชาการ ครั้งที่ 4 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.

Axelsson, L.T. (1993) **Lactic acid bacteria: classification and physiology**. InLactic Acid Bacteria. Salminen, S. and von Wright, A., eds. Marcel Dekker, Inc.New York. p. 1–63.

Axelsson,H (1998). **Lactic acid Bacteria: Classification and physiology.** In S. Salm iA.von

Delliagilio,F.,L.M.T. Dicks and S.Torriani. 1995. **The genus *Leuconostoc*. p.** 235- 278 In B.J.B.

Ennahar S, Asou Y, Zendo T, Sonomoto K, Ishizaki A. 2001. Biochemical ans genetic evidence for production of enterocins A and B by Enterococcus faecium WHE 81**.** International Journal of Food Microbiology. 70: 291–301

Hector, R., Jose, A.C., Landete, J.M., Rivas, B.D. 2009**. Food phenolics and lactic acid bacteria.** International Journal of Food Microbiology. 132: 79–90.

Herzler,S.R., Clancy, S.M,.2003. **Kefir improver lactose digestion and tolerance in. Idults with lactose mal-digestion**. Journal of the American Dieteliti. Association. 103: 582-587

Hoover, G. and Steenson, L.R.1993. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. Academic Press Inc., New York.

Miyashita, M., Yukphan,. P., Chaipitacharaen., W., Malimas, T,. Sugimoto, M,.Yoshino, M,.Potacharien,. K.L. 2012. **16s rDNA gene sequence analysis of lactic acid bacteria Isolated from fermented foods in Thailand**. Microbiol. Cult. Coll. 28 (1); 1-9

Mohamed Ali Abdel-Rahman, Yukihiro Tashiro and Kenji Sonomoto. 2011. **Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acidbacteria: Overview and limits.** Journal of Biotechnology

Oupathumpanont, O,. Chantarapanont,. w,. Suwonsichon,. T., Haruthaitanasan, V. and Chompreede, I. 2009. **Screening Lactic Acid Bacteria for improving the kanom-jeen process.** Kasetsart J. (Nat.Sci). 43: 557-565

Pereira, A.L.F,. Tatiane, C,.Maciel, S. 2011. **Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casri***. Food Research international. 44:1276-1283.

Steinkraus,K.H. 1996. **Handbook of indigenous fermented food**.Marcel Dekker, Inc. NewYork

Spelhaug S.R.and Harlander.(1989). **Inhibition bacteria of foods and their current taxonomy** J.food Microbiol, 36,1-29.

Schrezenminer, J., de Vers M. 2001. **Pribiotic and Synbiotics-approaching a difinittion.** Am J. Clin. Nutr. 73 (2):361-364.

Steinkraus, K.H 1997**Clasification of fermented foods**: worldwide rewiew of house hold Fermentation tecniques. Food control.8,.311-317.

Stiles, M.E,.and Holzapfel, W.H., 1997. **Lactic acid bacteria of Food and their current Taxonomy.** Internationnal Journal of Food Microbiology. 36:1- 29.

Swetwiwathana, A,. Pilasombat, K. and Selthakul, J. 2009. **An in Vitro Screening of isolates Bacteriocin-producing lactic acid bacteria from Thai fermented meat for probiotic Prospect**. 26-28 August 2009.Khonkean, Thailand.

Teuber, M. 1995. The genus lactococcus, In:Wood, B.J.B. and Holzalpfl, W.H. **the Genera of Lactic acid bacteria**: Blackie Academic and Professionnal. 173- 234.

Verseeharan,B. and Ramasamy,P. 2003.**Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for blacktiger shrimp Panaeus monodon**. Letter in AppliedMicrobiology.36:83:88

Wang, C.Y., P.R., Chang-Chai, N.g., Shyu, Y.T. 2010 **Probiotic properties of *Lactobacillus* strains Isolated from the feces of breast-fed infents and Taiwanese Pickled cabbage**. Clinical Microbiology. Anaerobe.16:578- 585.

Wright DekkerCaplis, E., and Fitzgerald, G. F. 1999. **Food fermentations** : role of microorganisms in food production and preservation.International Journal of Food Microbiology 50: 131-149.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1.DE Man, Rogasa and sharpe agar (MRS) ประกอบด้วย

Peptone from casein	10.0	กรัม
Meat extract	8.0	กรัม
D (+) Glucose	20.0	กรัม
Yeast extraet	4.0	กรัม
Di-Potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
Di-Ammonium hydrogen citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sufate	0.04	กรัม
Agar	14.0	กรัม

1.2 Demen Rogosa and sharpe both (MRS broth)

Peptone frorm cas	10.0	กรัม
Meat extract	8.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
D (+) Glucose	20.0	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
di-ammonium hydrogen citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfte	0.2	กรัม
Manganese sulfte	0.04	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS 55.15 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ

- อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS เติม bromocrsolprple 0.004 เปอร์เซ็นในน้ำกลั่น1,000มิลลิลิตเติมหลังจากเติมอาหารลงไป

1.3 Mueller Hinton agar (MHA)

Infusion from meat	2	กรัม
Casein hydrolysate	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	13	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH 7.4±0.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4 Standard Plate Count Agar (PCA)

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA 23.5 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.5 Nutrient Broth (NB)

Peptone	5	กรัม
Beef axtract	3	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ NB 13 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สารเคมี

1. ชุดย้อมสีแกรม

1.1 Crystal violet	5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
1.2 Gram iodine solution		
Iodine	1	กรัม
Potassium iodide	2	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
1.3 Decolorizer		
Ethanol, 95%	250	มิลลิลิตร
Acetone	250	มิลลิลิตร
1.4 Safranin O solution		
Safranin O	2.5	กรัม
Ethanol,95%	100	มิลลิลิตร

2. Mcfarland standard No.0.5 (มาลิน, 2540)

H_2SO_4 1%	995	มิลลิลิตร
$BaCl_2.2H_2$	5	มิลลิลิตร

ดูด H_2SO_4 10 ml ใส่ในบีกเกอร์ แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 L ชั่งสาร $BaCl_2$ 1 g ใส่ในขวดปรับปริมาตรแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 ml นำสารละลายใน H_2SO_4ปริมาตร 995 ml และสารละลาย $BaCl_2$ ปริมาตร 5 ml มาผสม และคนให้เข้ากัน นำสารละลาย McFarland standard No.0.5 ที่ได้มาบรรจุใส่หลอดฝาเกลียวปิด ฝาให้สนิทกันการระเหยแล้วเก็บในที่มืด ที่อุณหภูมิ 2-30 ^{0}C ก่อนใช้งานต้องเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อน

ภาคผนวก ข

ภาพการทดลอง

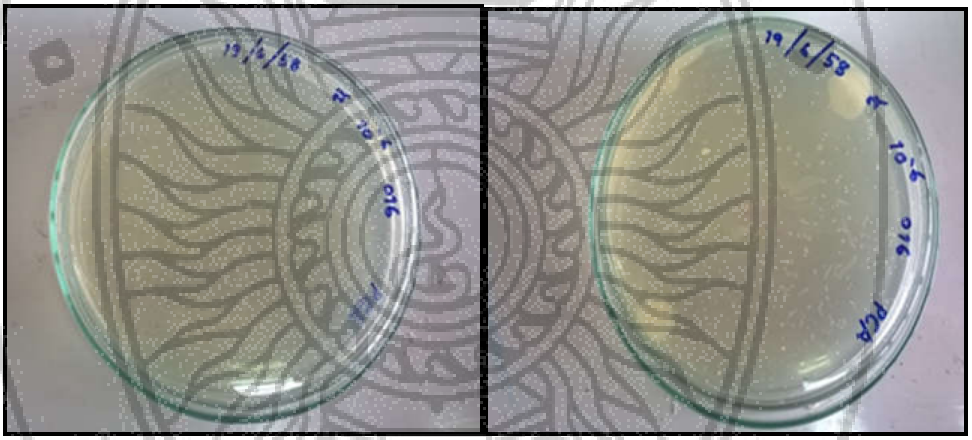
ภาพผลการทดลอง

1. ลักษณะจุลินทรีย์ทั้งหมดในแต่ละตัวอย่าง

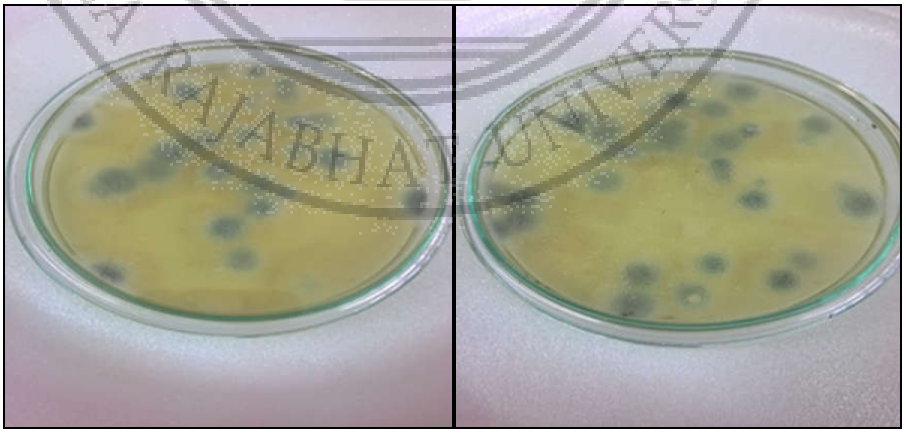
ภาพที่ 1 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างลูกเนียงดอง

ภาพที่ 2 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างกระท้อนดอง

ภาพที่ 3 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างขมิ้นขาวดอง



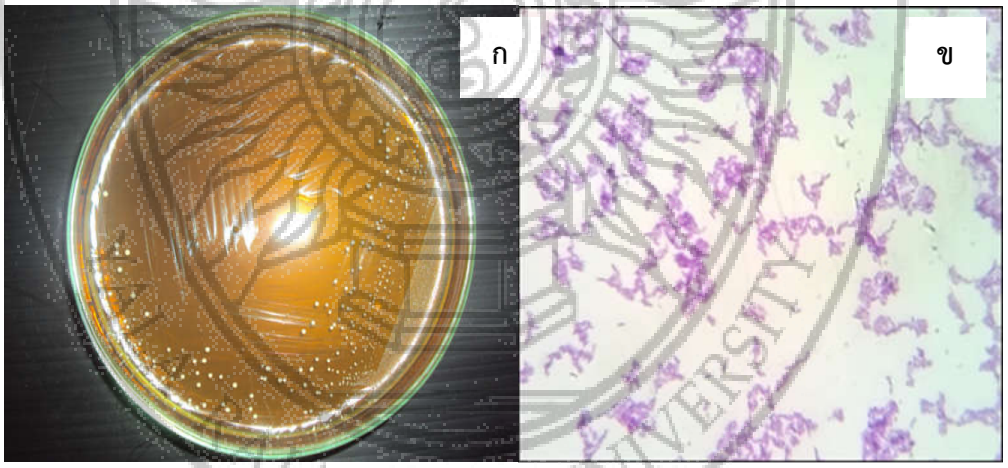
ภาพที่ 4การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่าง ผักเสี้ยนดอง



ภาพที่ 5 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างลูกตะขบดอง

ภาพที่ 6 การนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างตะลิงปลิงดอง

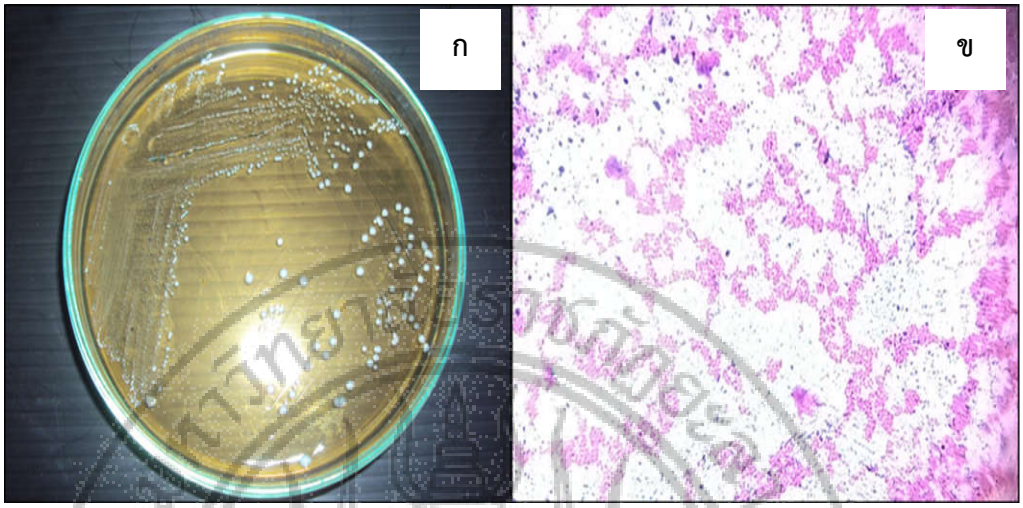
2. ลักษณะเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร Deman, Rogasa and sharpe agar(MRS agar) และภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ภาพที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ก. ลักษณะโคโลนีเชื้อ TA1 ที่เจริญบนอาหาร MRS agar

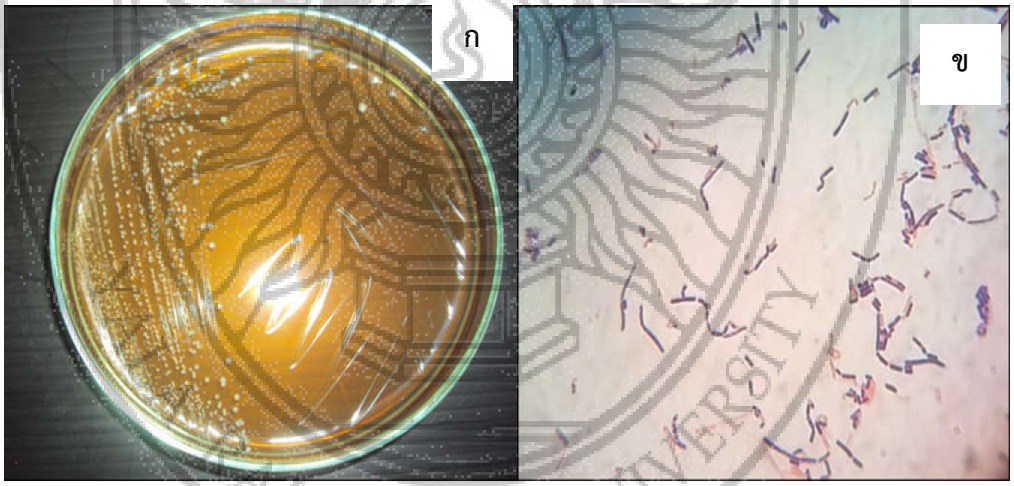
ข. ภาพใต้กล้อง มีรูปร่างกลม ติดสี แกรมบวก



ภาพที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ก. ลักษณะโคโลนีเชื้อ P2 ที่เจริญบนอาหาร MRS

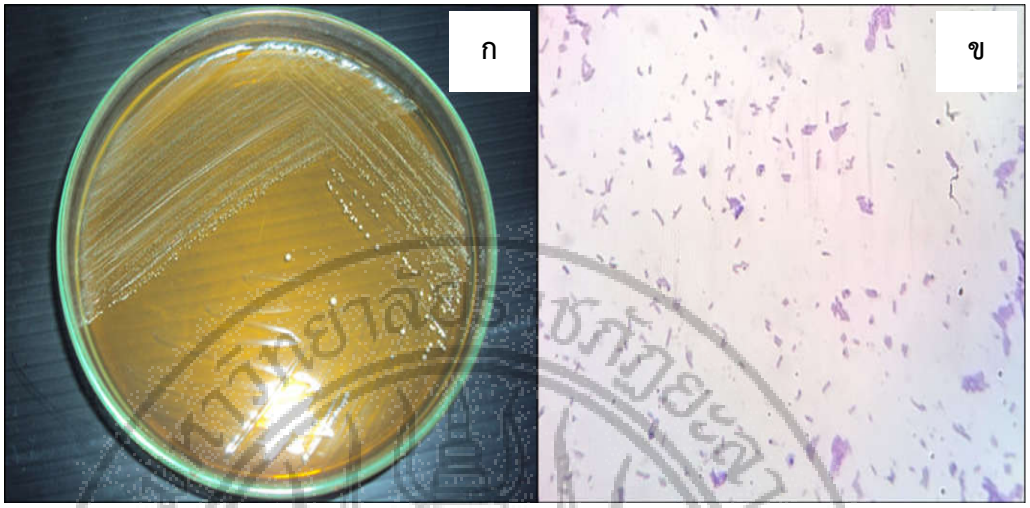
ข. ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ มีรูปร่างกลม แกรมบวก



ภาพที่ 9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ก. ลักษณะโคโลนีเชื้อ N5 ที่เจริญบนอาหาร MRS

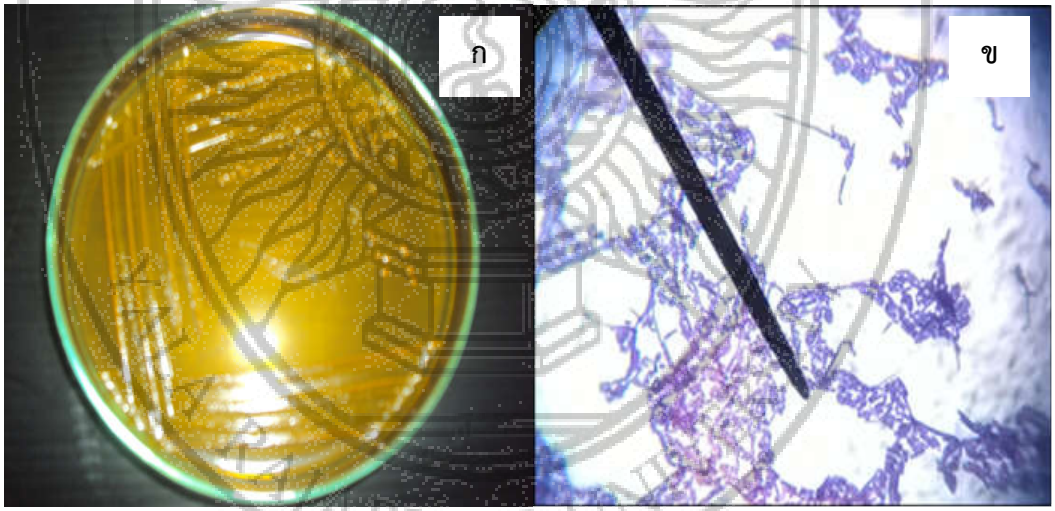
ข. ภาพใต้กล้อง มีรูปร่างท่อน แกรมบวก



ภาพที่ 10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ก. ลักษณะโคโลนีเชื้อ N4 ที่เจริญบนอาหาร MRS

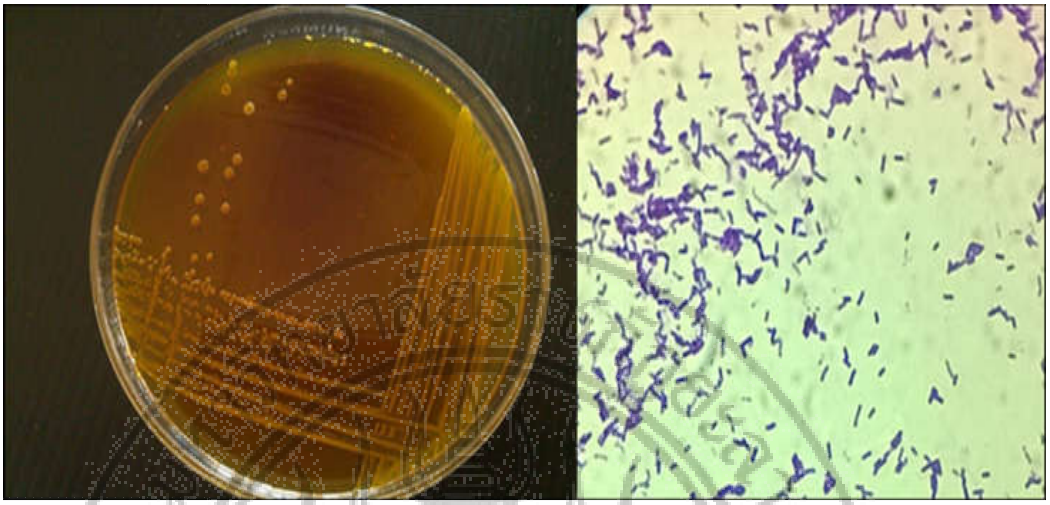
ข. ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ มีรูปร่างกลม แกรมบวก



ภาพที่ 11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ก. ลักษณะโคโลนีเชื้อ S1 ที่เจริญบนอาหาร MRS

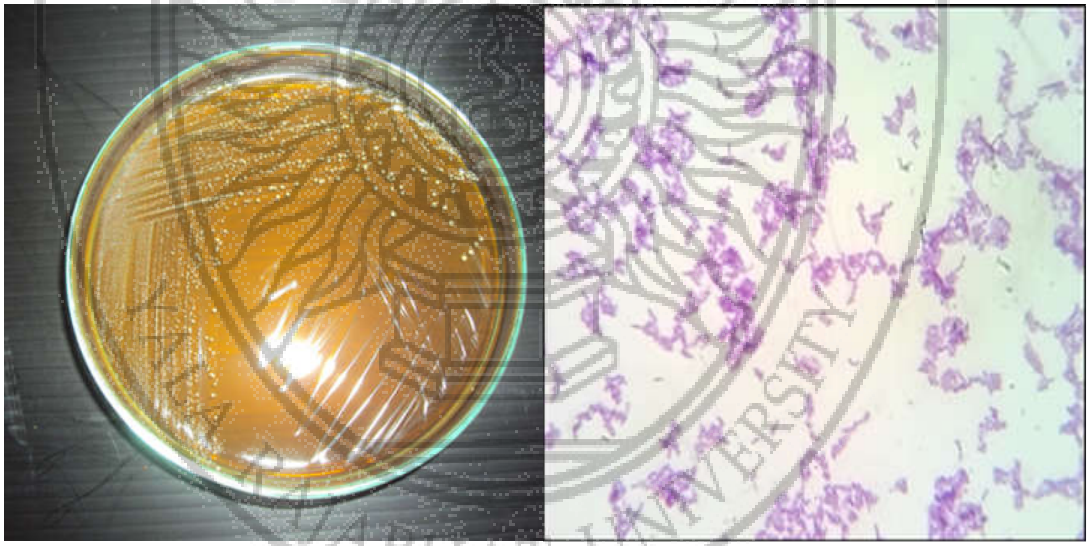
ข. ลักษณะของเซลล์จากภาพใต้ มีรูปร่างท่อน แกรมบวก



ภาพที่ 12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ก. ลักษณะโคโลนีเชื้อ S2 อาหาร MRS agar

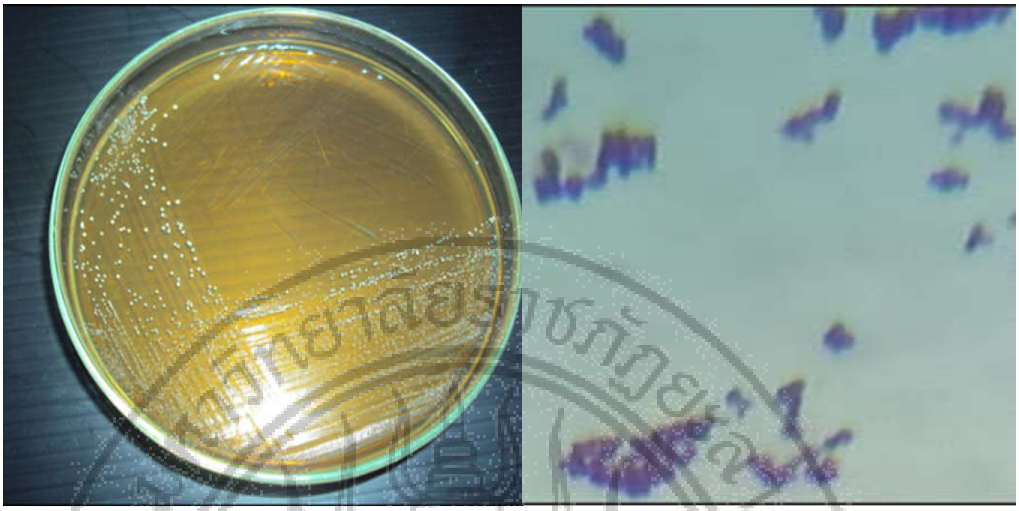
ข. ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ มีรูปร่างท่อน แกรมบวก



ภาพที่ 13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ก. ลักษณะโคโลนีเชื้อ T อาหาร MRS agar

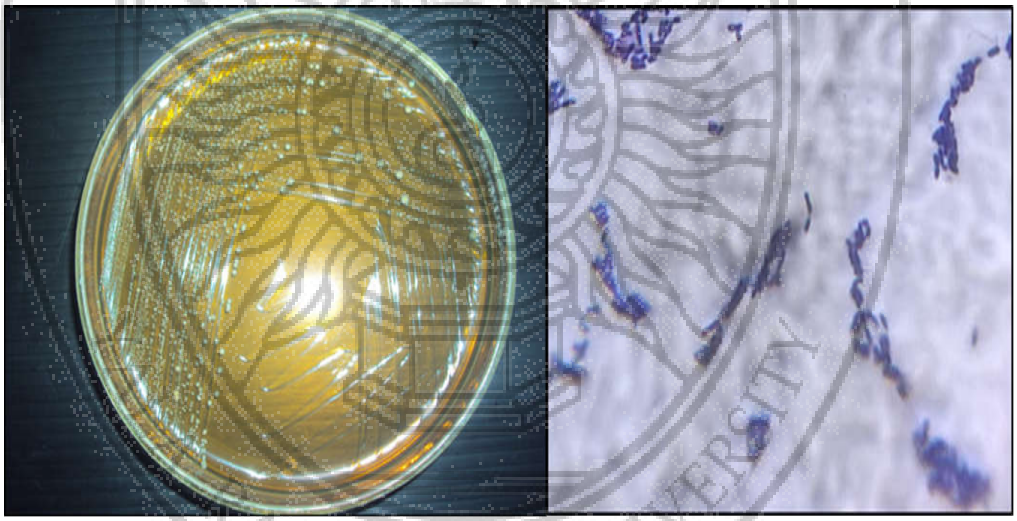
ข. ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ มีรูปกลม แกรมบวก



ภาพที่ 14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ก. ลักษณะโคโลนีเชื้อ TA3 T อาหาร MRS agar

ข. ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รูปร่างกลม แกรมบวก



ภาพที่ 15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ก. ลักษณะโคโลนี**เชื้อ**ไอโซเลต TA2 ที่เจริญบนอาหาร MRS agar

ข. ภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ รูปร่างกลมรี แกรมบวก

4.ลักษณะการทดสอบคะตะเลสเทสบนแผ่นสไลด์

ภาพที่ 16 การทดสอบคะตะเลส

5. ลักษณะการทดสอบการทนเกลือ

ภาพที่ 17 ทดสอบความทนเกลือ

6. ลักษณะการทดทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

ภาพที่ 18 ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

7. ลักษณะการทดสอบการสร้างก๊าซ

ภาพที่ 19 ทดสอบการสร้างก๊าซ

ประวัติคณะผู้วิจัย

- **หัวหน้าโครงการ**

1. ชื่อ - สกุล นางสาวนุรอัยนี หะยียูโซะ

Miss Nur-ainee Hayeeyusoh

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3940900450084

3. ตำแหน่งปัจจุบัน : อาจารย์พนักงานมหาวิทยาลัย

4. หน่วยงานที่ติดต่อได้ : สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา โทรศัพท์: 081-5437235

E-mail: hnurainee@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา :

- ปริญญาตรี, (วท.บ.) ชีววิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
- ปริญญาโท, M. Sc, Microbiology, Universiti Kebangsaan Malaysia, ประเทศมาเลเซีย

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา):

-

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

วิทยานิพนธ์

The production of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* SN5 by repeated batch culture

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว :

นุรอัยนี หะยียูโซะ, คอสียาห์ สะลี, อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, ซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ และพูรกอนนี สาและ. 2558. **การตรวจเชื้อ *Cryptococcus neoformans* จากมูลนกและไก่ในเขตจังหวัดยะลา.** ยะลา**.** มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, คอสียาห์ สะลี และนุรอัยนี หะยียูโซะ. 2558. **การหาสภาวะเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราติเนสของแบคทีเรียสายพันธุ์คัดแยกจากท้องถิ่น.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (ผู้ร่วมวิจัย)

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, คอสียาห์ สะลี และนุรอัยนี หะยียูโซะ. 2557. **การหาสภาวะเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราติเนสของฟังไจสายพันธุ์คัดแยกจากท้องถิ่น.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (ผู้ร่วมวิจัย)

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, คอสียาห์ สะลี, นุรอัยนี หะยียูโซะ และอัมพร ท่าดะ. 2557. **คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารปรุงเสร็จและน้ำบริโภคที่จัดจำหน่ายในสถาบันอุดมศึกษาจังหวัดยะลา ปัตตานีและนราธิวาส.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (ผู้ร่วมวิจัย)

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, คอสียาห์ สะลี, นุรอัยนี หะยียูโซะ และอัมพร ท่าดะ. 2557. **คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารที่จัดใด้เด็กนักเรียนระดับประถมศึกษาในพื้นที่จังหวัดยะลา.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (ผู้ร่วมวิจัย)

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, คอสียาห์ สะลี, นุรอัยนี หะยียูโซะ และอัมพร ท่าดะ. 2557. **คุณภาพอากาศทางจุลชีววิทยาของสำนักงานและห้องเรียนในมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (ผู้ร่วมวิจัย)

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, คอสียาห์ สะลี, นุรอัยนี หะยียูโซะ และมุสลีฮาวาตี วาเงาะ. 2555. **การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์เคราติเนสจากสิ่งแวดล้อมท้องถิ่นและประสิทธิภาพการย่อยสลายสารทิ้งเคราติน.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (ผู้ร่วมวิจัย)

นุรอัยนี หะยียูโซะ. 2554. **การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำผลไม้หมักจากผลไม้ท้องถิ่น.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

1.1 บทความ (ถ้ามี)

นุรอัยนี หะยียูโซะ, อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, นุรมา เจะเลาะ. 2558. การคัดแยกเชื้อรา *Mucor* sp. จากลูกแป้งข้าวหมากในท้องถิ่น. ใน **การรายงานการประชุมวิชาการ ระดับชาติ ครั้งที่ 4 การวิจัยและนวัตกรรมเพื่อพัฒนาท้องถิ่นสู่ประชาคมอาเซียนประจำปี 2558 วันที่ 5 สิงหาคม 2558 (**57-63). นราธิวาส. มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์.

คอสียาห์ สะลี, อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, นุรอัยนี หะยียูโซะ, พูรกอนนี สาและ และสุไหมยะห์ เจ๊ะเต๊ะ. 2558. การควบคุมโดยชีววิธีเชื้อรา *phytophthora* sp. สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนโดยใช้เชื้อ *Bacillus* sp. ใน **วารสารงานประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 4 การวิจัยและนวัตกรรมเพื่อพัฒนาท้องถิ่นสู่ประชาคมอาเซียนประจำปี 2558 วันที่ 5 สิงหาคม 2558** (108-114). นราธิวาส. มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์.

รอฮีมะห์ มอลอ, คอสียาห์ สะลี, อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, และนุรอัยนี หะยียูโซะ. 2558. คุณภาพทางจุลชีววิทยาในอาหารพร้อมบริโภคที่จำหน่ายในสถาบันอุดมศึกษาในเทศบาลนครยะลา. ใน **รายงานการประชุมวิชาการ: การนำเสนอผลงานวิจัยของนักศึกษาระดับปริญญาตรี วันที่ 12-13 กุมภาพันธ์ 2558** (142-149). นครศรีธรรมราช. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช.

นุรอัยนี หะยียูโซะ และยามีละห์ เจ๊ะปอ. 2557. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างไส้กรอกข้าว. ใน **รายงานการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับปริญญาตรีด้านชีววิทยา ครั้งที่ 3 วันที่ 10-11 มีนาคม 2557.** สุราษฎร์ธานี. มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี.

นุรอัยนี หะยียูโซะ, คอสียาห์ สะลี และอามีร์ โตะนากายอ. 2557. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในยางพาราของเชื้อ *Tricoderma* spp. ที่คัดแยกจากดินในท้องถิ่น และ *Tricoderma harzianum* ที่วางจำหน่ายในท้องตลาด. ใน **รายงานการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับปริญญาตรีด้านชีววิทยา ครั้งที่ 3 วันที่ 10-11 มีนาคม 2557**. สุราษฎร์ธานี. มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี.

นุรอัยนี หะยียูโซะ และฟาดีละห์ มะเด็ง. 2556. การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลจากกระดาษเหลือใช้โดยเชื้อ *Trichoderma reesei* TISTR 3081 และ *Sacchromyces cerevisiae*. โดยผ่านกระบวนการ shake flask.. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร. 17(1):88-95.**

คอสียาห์ สะลี อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี นุรอัยนี หะยียูโซะ และมูซตากีม เจ๊ะมะ. 2556. การคัดแยกเชื้อราผลิตเอนไซม์เคราติเนสจากตัวอย่างดินในท้องถิ่น. **วารสารวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีการเกษตร. 17(1): 101-105.**

Abdullah Dolah Dalee, Nurhafeeza Ya, Khosiya Sali, Nur-ainee Hayeeyusoh, Zubaidah Hajiwagoh and Phurkonni Salaeh. 2015. Antimicrobial substances from endophytic fungi in Tamarind *(Tamarindusindica*, Linn), Malay Apple (*Eugenia malaccensis*,Linn), Rambutan (Nephelium lappaceum), and Indian mulberry (Morin citrifolia,Linn). **Proceeding of the 2nd International Conference on Research, Implementation and Education of Mathematics and Science 2015 on 17-19 May 2015** (B-1-B-10). Yogyakarta. Yogyakarta State University

Abdullah Dolah Dalee, Saranyu Mukhorah, Khosiya Sali, Nur-ainee Hayeeyusoh, Zubaidah Hajiwagoh and Phurkonni Salaeh. 2015. Synergy effect of local guava, carambola or Kariyat extracts and Tetracycline in inhibitiong the growth of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. , clinically isolated fromYingo Hospital, Narathiwat province, Southern Thailand. **Proceeding of the 2nd International Conference on Research, Implementation and Education of Mathematics and Science 2015 on 17-19 May 2015** (B-17-B-26). Yogyakarta. Yogyakarta State University.

Nur-ainee Hayeeyusoh, Friduas Baima, Abdullah Dolah Dalee, and Khosiya Sali. 2015. Effect of local Medical Plant on Growth of Leaf Spot Disease-Causing Colletotrichum gloeosporiodes**. Proceeding of the 2nd International Conference on research, Implementation and Education of Mathematics and Science 2015 on 17-19 May 2015 (B-41-B-47)**. Yogyakarta. Yogyakarta State University.

- **ผู้วิจัยร่วม**

1. **ชื่อ - สกุล** นางสาวคอสียาห์ สะลี

Miss KHOSIYA SALI

2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน:** 3950600528169
3. **ตำแหน่งปัจจุบัน :** อาจารย์อัตราจ้าง
4. **หน่วยงานที่ติดต่อได้ :** สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

โทรศัพท์: 084-8531948 E-mail: khosiya_s@yahoo.com

5. **ประวัติการศึกษา :**
   - ปริญญาตรี (วท.บ.) ชีววิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
   - ปริญญาโท M. Sc Microbiology, Universiti Kebangsaan Malaysia, ประเทศมาเลเซีย

6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ(แตกต่างจากวุฒิการศึกษา:**
   -

7. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ**

   7.1 วิทยานิพนธ์

   - The production of CGTase by alkalophilic *Bacillus* sp. G1 in continuous culture

   7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน

นุรอัยนี หะยียูโซะ, คอสียาห์ สะลี, อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, ซูไบดะ หะยีวาเงาะ และพูรกอนนี สาและ. 2558. **การตรวจเชื้อ *Cryptococcus neoformans* จากมูลนกและไก่ในเขตจังหวัดยะลา.** ยะลา**.** มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (ผู้ร่วมวิจัย)

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, คอสียาห์ สะลี และนุรอัยนี หะยียูโซะ. 2557. **การหาสภาวะเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราติเนสของแบคทีเรียสายพันธุ์คัดแยกจากท้องถิ่น.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (ผู้ร่วมวิจัย)

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, คอสียาห์ สะลี และนุรอัยนี หะยียูโซะ. 2557. **การหาสภาวะเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราติเนสของฟังไจสายพันธุ์คัดแยกจากท้องถิ่น.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (ผู้ร่วมวิจัย)

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, คอสียาห์ สะลี, นุรอัยนี หะยียูโซะ และอัมพร ท่าดะ. 2557**. คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารปรุงเสร็จและน้ำบริโภคที่จัดจำหน่ายในสถาบันอุดมศึกษาจังหวัดยะลา ปัตตานีและนราธิวาส.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (ผู้ร่วมวิจัย)

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, คอสียาห์ สะลี, นุรอัยนี หะยียูโซะ และอัมพร ท่าดะ. 2557. **คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารที่จัดใด้เด็กนักเรียนระดับประถมศึกษาในพื้นที่จังหวัดยะลา.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (ผู้ร่วมวิจัย)

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, คอสียาห์ สะลี, นุรอัยนี หะยียูโซะ และอัมพร ท่าดะ. 2557. **คุณภาพอากาศทางจุลชีววิทยาของสำนักงานและห้องเรียนในมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (ผู้ร่วมวิจัย)

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, คอสียาห์ สะลี, นุรอัยนี หะยียูโซะ และมุสลีฮาวาตี วาเงาะ. 2555. **การคัดแยกจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์เคราติเนสและการทดสอบประสิทธิภาพเอนไซม์.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (ผู้ร่วมวิจัย)

คอสียาห์ สะลี. 2554. **การแยกจุลินทรีย์ผลิตเคราติเนสและทดสอบคุณสมบัติพื้นฐานของเอนไซม์เคราติเนส.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

7.3 บทความ (ถ้ามี)

คอสียาห์ สะลี, อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, นุรอัยนี หะยียูโซะ, พูรกอนนี สาและ และสุไหมยะห์ เจ๊ะเต๊ะ. 2558. การควบคุมโดยชีววิธีเชื้อรา *phytophthora* sp. สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนโดยใช้เชื้อ *Bacillus* sp. ใน **รายงานการประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 4 การวิจัยและนวัตกรรมเพื่อพัฒนาท้องถิ่นสู่ประชาคมอาเซียนประจำปี 2558 วันที่ 5 สิงหาคม 2558** (108-114). นราธิวาส. มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์.

รอฮีมะห์ มอลอ, คอสียาห์ สะลี, อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, และนุรอัยนี หะยียูโซะ. 2558. คุณภาพทางจุลชีววิทยาในอาหารพร้อมบริโภคที่จำหน่ายในสถาบันอุดมศึกษาในเทศบาลนครยะลา**.** ใน **รายงานการประชุมวิชาการ: การนำเสนอผลงานวิจัยของนักศึกษาระดับปริญญาตรี วันที่ 12-13 กุมภาพันธ์ 2558** (142-149). นครศรีธรรมราช. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช.

นุรอัยนี หะยียูโซะ, คอสียาห์ สะลี และอามีร์ โตะนากายอ. 2557. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราก่อโรคในยางพาราของเชื้อ *Tricoderma* spp. ที่คัดแยกจากดินในท้องถิ่น และ *Tricoderma harzianum* ที่วางจำหน่ายในท้องตลาด. ใน **รายงานการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับปริญญาตรีด้านชีววิทยา ครั้งที่ 3 วันที่ 10-11 มีนาคม 2557**. สุราษฎร์ธานี. มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี.

คอสียาห์ สะลี อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี นุรอัยนี หะยียูโซะ และมูซตากีม เจ๊ะมะ. 2556. การคัดแยกเชื้อราผลิตเอนไซม์เคราติเนสจากตัวอย่างดินในท้องถิ่น. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร. 17(1): 101-105.**

Abdullah Dolah Dalee, Nurhafeeza Ya, Khosiya Sali, Nur-ainee Hayeeyusoh, Zubaidah Hajiwagoh and Phurkonni Salaeh. 2015. Antimicrobial substances from

endophytic fungi in Tamarind *(Tamarindusindica*, Linn), Malay Apple (*Eugenia malaccensis*,Linn), Rambutan (Nephelium lappaceum), and Indian mulberry (Morin citrifolia, Linn). **Proceeding of the 2nd International Conference on Research, Implementation and Education of Mathematics and Science 2015 on 17-19 May 2015** (B-1-B-10). Yogyakarta. Yogyakarta State University.

Abdullah Dolah Dalee, Saranyu Mukhorah, Khosiya Sali, Nur-ainee Hayeeyusoh, Zubaidah Hajiwagoh and Phurkonni Salaeh. 2015. Synergy effect of local guava, carambola or Kariyat extracts and Tetracycline in inhibitiong the growth of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. , clinically isolated fromYingo Hospital, Narathiwat province, Southern Thailand. **Proceeding of the 2nd International Conference on Research, Implementation and Education of Mathematics and Science 2015 on 17-19 May 2015** (B-17-B-26). Yogyakarta. Yogyakarta State University.

Nur-ainee Hayeeyusoh, Friduas Baima, Abdullah Dolah Dalee, and Khosiya Sali. 2015. Effect of local Medical Plant on Growth of Leaf Spot Disease-Causing Colletotrichum gloeosporiodes**. Proceeding of the 2nd International Conference on research, Implementation and Education of Mathematics and Science 2015 on 17-19 May 2015** (B-41-B-47). Yogyakarta. Yogyakarta State University.

ผู้วิจัยร่วม

1. **ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย)** นายอับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี
   ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) MR. ABDULLAH DOLAH DALEE
2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน** 5-9505-00019-84-6
3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** อาจารย์ ระดับ 7
4. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสารและ email**

   สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์
   คณะวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
   โทรศัพท์ 0819570767
   อีเมล์ dolah.dalee@yahoo.com

5. **ประวัติการศึกษา**

ปริญญาตรี B. Sc (Hons.), Microbiology จาก University of Karachi ประเทศปากีสถาน

ปริญญาโท M. Sc, Microbiology จาก University of Karachi ประเทศปากีสถาน

ปริญญาโท M. Sc Microbiology จาก Universiti Kebangsaan Malaysia ประเทศมาเลเซีย

ปริญญาโท M. MS (Management Science) จาก University of Technology Sydney ประเทศออสเตรเลีย

6. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ**

-

7. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทางภายในและภายนอกประเทศ**

7.1 วิทยานิพนธ์

The pathogenicity and antigenicity of extracellular protease(s) from *Burkholderia pseudomallei*

7.2 งานวิจัย

นุรอัยนี หะยียูโซะ, คอสียาห์ สะลี, อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, ซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ และพูรกอนนี สาและ. 2558. **การตรวจเชื้อ *Cryptococcus neoformans* จากมูลนกและไก่ในเขตจังหวัดยะลา.** ยะลา**.** มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (ผู้ร่วมวิจัย)

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, คอสียาห์ สะลี และนุรอัยนี หะยียูโซะ. 2559. **การหาสภาวะเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราติเนสของแบคทีเรียสายพันธุ์คัดแยกจากท้องถิ่น**. ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, คอสียาห์ สะลี และนุรอัยนี หะยียูโซะ. 2559. **การหาสภาวะเหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เคราติเนสของฟังไจสายพันธุ์คัดแยกจากท้องถิ่น**. ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี. 2558. **ผลของสารสกัดจากใบฝรั่ง ใบยอ ใบมะเฟืองและฟ้าทะลายโจรร่วมกับยาปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อก่อโรคท้องร่วงที่คัดแยกทางคลีนิกจากโรงพยาบาลยี่งอ**. ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, คอสียาห์ สะลี, นุรอัยนี หะยียูโซะ และอัมพร ท่าดะ. 2558. **คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารปรุงเสร็จและน้ำบริโภคที่จัดจำหน่ายในสถาบันอุดมศึกษาจังหวัดยะลา ปัตตานีและนราธิวาส.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, คอสียาห์ สะลี, นุรอัยนี หะยียูโซะ และอัมพร ท่าดะ. 2557. **คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารที่จัดใด้เด็กนักเรียนระดับประถมศึกษาในพื้นที่จังหวัดยะลา.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, คอสียาห์ สะลี, นุรอัยนี หะยียูโซะ และมุสลีฮาวาตี วาเงาะ. 2555. **การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์เคราติเนสจากสิ่งแวดล้อมท้องถิ่นและประสิทธิภาพการย่อยสลายสารทิ้งเคราติน**. ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

อัชมาน อาแด และดอเล๊าะ ดาลี. 2554. **การสังเคราะห์ L-quebrachitol และประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียและรา่ก่อโรคบางชนิด**. ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

ดอเล๊าะ ดาลี. 2552**. การแพร่กระจายของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. ในตัวอย่างอาหารของชุมชนนักเรียนนักศึกษาจังหวัดยะลา ปัตตานีและนราธิวาส**. ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

7.3 บทความ (ถ้ามี)

คอสียาห์ สะลี, อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, นุรอัยนี หะยียูโซะ, พูรกอนนี สาและ และสุไหมยะห์ เจ๊ะเต๊ะ. 2558. การควบคุมโดยชีววิธีเชื้อรา *phytophthora* sp. สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนโดยใช้เชื้อ *Bacillus* sp. ใน **รายงานการประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 4 การวิจัยและนวัตกรรมเพื่อพัฒนาท้องถิ่นสู่ประชาคมอาเซียนประจำปี 2558 วันที่ 5 สิงหาคม 2558** (108-114). นราธิวาส. มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์.

สุกัลญา หมาดเกบ และอับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี. 2557. คุณภาพอากาศทางจุลชีววิทยาของห้องเรียนและสำนักงานในมหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. ใน **การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับปริญญาตรีด้านชีววิทยา ครั้งที่ 3 วันที่ 10-11 มีนาคม 2557.** สุราษฎร์ธานี. มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี.

คอสียาห์ สะลี อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี นุรอัยนี หะยียูโซะ และมูซตากีม เจ๊ะมะ. 2556. การคัดแยกเชื้อราผลิตเอนไซม์เคราติเนสจากตัวอย่างดินในท้องถิ่น. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร.** 17(1): 101-105.

Abdullah Dolah Dalee, Nurhafeeza Ya, Khosiya Sali, Nur-ainee Hayeeyusoh, Zubaidah Hajiwagoh and Phurkonni Salaeh. 2015. Antimicrobial substances from endophytic fungi in Tamarind *(Tamarindusindica*, Linn), Malay Apple (*Eugenia malaccensis*,Linn), Rambutan (Nephelium lappaceum), and Indian mulberry (Morin citrifolia,Linn). **Proceeding of the 2nd International Conference on Research, Implementation and Education of Mathematics and Science 2015 on 17-19 May 2015** (B-1-B-10). Yogyakarta. Yogyakarta State University.

Abdullah Dolah Dalee, Saranyu Mukhorah, Khosiya Sali, Nur-ainee Hayeeyusoh, Zubaidah Hajiwagoh and Phurkonni Salaeh. 2015. Synergy effect of local guava, carambola or Kariyat extracts and Tetracycline in inhibitiong the growth of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. , clinically isolated fromYingo Hospital,

Narathiwat province, Southern Thailand. **Proceeding of the 2nd International Conference on Research, Implementation and Education of Mathematics and Science 2015 on 17-19 May 2015** (B-17-B-26). Yogyakarta. Yogyakarta State University.

Nur-ainee Hayeeyusoh, Friduas Baima, Abdullah Dolah Dalee, and Khosiya Sali. 2015. Effect of local Medical Plant on Growth of Leaf Spot Disease-Causing Colletotrichum gloeosporiodes**. Proceeding of the 2nd International Conference on research, Implementation and Education of Mathematics and Science 2015 on 17-19 May 2015** (B-41-B-47). Yogyakarta. Yogyakarta State University.

- **ผู้วิจัยร่วม**

1 **ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย)** นางซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ

2. **ตำแหน่งปัจจุบัน** พนักงานมหาวิทยาลัย

3. **หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสารและ email**

สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา
โทรศัพท์ 0819570767
อีเมล์ dolah.dalee@yahoo.com

4. ผลงานวิชาการ

4.1 งานวิจัย

นุรอัยนี หะยียูโซะ, คอสียาห์ สะลี, อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, ซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ และพูรกอนนี สาและ. 2558. **การตรวจเชื้อ *Cryptococcus neoformans* จากมูลนกและไก่ในเขตจังหวัดยะลา.** ยะลา**.** มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (ผู้ร่วมวิจัย)

ซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ. 2554. **การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อราจากวัตถุดิบทางการเกษตร.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

ซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ และอัชมาน อาแด. 2554. **ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจากสารสกัดสมุนไพร.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

ซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ และอัชมาน อาแด. 2553. **ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคจากสารสกัดพืชสมุนไพร.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

อิสริยาภรณ์ ดำรงรักษ์, ซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ และอับดุลรอฮิม เปาะอีแต. 2553. **ผลของการใส่ปุ๋ยชนิดต่างๆ ต่อผลผลิตสมบัติของดินและผลตอบแทนทางเศรษฐกิจในสวนยางที่เปิดกรีดแล้ว.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (ผู้ร่วมวิจัย)

วิพัฒน์ ถาวโรฤทธิ์, ซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ, หัสลินดา บินมะแอ และลักขณา รักพันธ์. 2550. **ชนิดของเชื้อราที่เจริญบนยางแผ่นผึ่งแห้งและสารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (ผู้ร่วมวิจัย)

1.2 บทความ (ถ้ามี)

อาซียะ ระแว้ง, ซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ และพูรกอนนี สาและ. 2558. แบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหารปลาทะเลที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์. ใน **รายงานการประชุมวิชาการ: การนำเสนอผลงานวิจัยของนักศึกษาระดับปริญญาตรี "คุณภาพผู้เรียน คุณภาพครู" ครั้งที่ 58 วันที่ 12-13 กุมภาพันธ์ 2558** (135-141). นครศรีธรรมราช. มาหวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช.

อิสริยาภรณ์ ดำรงรักษ์, ซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ และอับดุลรอฮิม เปาะอีแต. 2554. ผลของการใช้ปุ๋ย ต่อปริมาณจุลินทรีย์ในดินปลูกยางพารา. ใน **รายงานการประชุมวิชาการดินและปุ๋ยแห่งชาติครั้งที่ 2 วันที่ 11-13 มิถุนายน 2554** (หน้า 790-800). เชียงใหม่. ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ แม่โจ้.

รุสนี ยะผา, นูรฮูดา กาแบ และซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ. 2553. การพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อราจากวัตถุดิบท้องถิ่น. ใน **รายงานการประชุมวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยและนวัตกรรมด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีครั้งที่ 2.** ยะลา. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

ซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ. 2552. *Helicobacter pylori* **:** แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคกระเพาะ. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** 13(1): 55-61.

ซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ. 2549. การตรวจหาเมแทบอไลท์ของเชื้อราชนิดเส้นใยที่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์. **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.** 10(1): 96-104.

Abdullah Dolah Dalee, Nurhafeeza Ya, Khosiya Sali, Nur-ainee Hayeeyusoh, Zubaidah Hajiwagoh and Phurkonni Salaeh. 2015. Antimicrobial substances from endophytic fungi in Tamarind *(Tamarindusindica*, Linn), Malay Apple (*Eugenia malaccensis*,Linn), Rambutan (Nephelium lappaceum), and Indian mulberry (Morin citrifolia, Linn). **Proceeding of the 2nd International Conference on Research, Implementation and Education of Mathematics and Science 2015 on 17-19 May 2015 (B-1-B-10).** Yogyakarta. Yogyakarta State University.

Abdullah Dolah Dalee, Saranyu Mukhorah, Khosiya Sali, Nur-ainee Hayeeyusoh, Zubaidah Hajiwagoh and Phurkonni Salaeh. 2015. Synergy effect of local guava, carambola or Kariyat extracts and Tetracycline in inhibitiong the growth of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. , clinically isolated fromYingo Hospital, Narathiwat province, Southern Thailand. **Proceeding of the 2nd International Conference on Research, Implementation and Education of Mathematics and Science 2015 on 17-19 May 2015 (B-17-B-26)**. Yogyakarta. Yogyakarta State University.

- **ผู้วิจัยร่วม**

1. ชื่อ - สกุล นางสาวพูรกอนนี สาและ

2. ตำแหน่งปัจจุบัน : อาจารย์พิเศษเต็มเวลา

3. หน่วยงานที่ติดต่อได้ : สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

โทรศัพท์: 084-8531948 E-mail: khosiya_s@yahoo.com

4. ประวัติการศึกษา :

- ระดับปริญญาโท สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางการเกษตร คณะ วิทยาศาสตร์เพื่อการเกษตร สำเร็จการศึกษา ตุลาคม 2556สถาบันการศึกษา Aligarh muslim university ประเทศอินเดีย

- ระดับปริญญาตรี สาขาวิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะ วิทยาศาสตร์เทคโนโลยี และการเกษตรสำเร็จการศึกษา 2553สถาบันการศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

5. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

5.1 วิทยานิพนธ์

- *Escherichia coli* of hospital waste water origin: Incidence of drug resistance, ES□L production & biofilm formation

5.2 งานวิจัย

นุรอัยนี หะยียูโซะ, คอสียาห์ สะลี, อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, ซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ และพูรกอนนี สาและ. 2558. **การตรวจเชื้อ *Cryptococcus neoformans* จากมูลนกและไก่ในเขตจังหวัดยะลา.** ยะลา**.** มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา. (ผู้ร่วมวิจัย)

5.3 บทความ (ถ้ามี)

พูรกอนนี สาและ. 2558. *Escherichia coli* from Hospital Wastewater Origin: Incidence of Drug Resistance, ESBL production. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 19(1): 17-35.

อาซียะ ระแว้ง, ซูไบด๊ะ หะยีวาเงาะ และพูรกอนนี สาและ. 2558. แบคทีเรียกรดแลกติกจากระบบทางเดินอาหารปลาทะเลที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์. ใน **รายงานการประชุมวิชาการ: การนำเสนอผลงานวิจัยของนักศึกษาระดับปริญญาตรี "คุณภาพผู้เรียน คุณภาพครู" ครั้งที่ 58**, 135-141. นครศรีธรรมราช. มาหวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช.

คอสียาห์ สะลี, อับดุลลาห์ โดลาห์ ดาลี, นุรอัยนี หะยียูโซะ, พูรกอนนี สาและ และสุไหมยะห์ เจ๊ะเต๊ะ. 2558. การควบคุมโดยชีววิธีเชื้อรา *phytophthora* sp. สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน

โดยใช้เชื้อ *Bacillus* sp. ใน **รายงานการประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 4 การวิจัยและนวัตกรรมเพื่อพัฒนาท้องถิ่นสู่ประชาคมอาเซียนประจำปี 2558**, 108-114.นราธิวาส. มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์.

Abdullah Dolah Dalee, Nurhafeeza Ya, Khosiya Sali, Nur-ainee Hayeeyusoh, Zubaidah Hajiwagoh and Phurkonni Salaeh. 2015. Antimicrobial substances from endophytic fungi in Tamarind *(Tamarindusindica*, Linn), Malay Apple (*Eugenia malaccensis*,Linn), Rambutan (Nephelium lappaceum), and Indian mulberry (Morin citrifolia,Linn). **Proceeding of the 2nd International Conference on Research, Implementation and Education of Mathematics and Science 2015 on 17-19 May 2015** (B-1-B-10). Yogyakarta. Yogyakarta State University.

Abdullah Dolah Dalee, Saranyu Mukhorah, Khosiya Sali, Nur-ainee Hayeeyusoh, Zubaidah Hajiwagoh and Phurkonni Salaeh. 2015. Synergy effect of local guava, carambola or Kariyat extracts and Tetracycline in inhibitiong the growth of *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. , clinically isolated fromYingo Hospital, Narathiwat province, Southern Thailand. **Proceeding of the 2nd International Conference on Research, Implementation and Education of Mathematics and Science 2015 on 17-19 May 2015** (B-17-B-26). Yogyakarta. Yogyakarta State University.