การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของ *Bacillus* spp

Antibacterial Activity of *Bacillus* spp. Against Foodborne Pathogens

สายใจ แก้วอ่อน*

Saichai Kaew-on*

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ประเทศไทย
Department of Science, Faculty of Science Technology and Agriculture, Yala Rajabhat University, Thailand

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียของ *Bacillus amyloliquefaciens* B17, *Bacillus amyloliquefaciens* B19, *Bacillus pumilus* B21 และ *Bacillus subtilis* B25 ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella* Typhimurium TISTR 292 และ *Salmonella* Typhimurium S003 การทดสอบโดยวิธี agar spot diffusion พบว่า *B. amyloliquefaciens* B19 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ดีกว่า *Bacillus* ชนิดอื่นๆ โดยยับยั้ง *E. coli* ATCC 8439, *E. coli* 0157:H7, *S. aureus* TISTR 118 และ *Salmonella* Typhimurium TISTR 292 และแสดงบริเวณการยับยั้ง *E. coli* 0157:H7 และ *S. aureus* TISTR 118 ได้สูงที่สุด ดังนั้นจึงทดสอบกิจกรรมการยับยั้งโดยวิธี Agar well diffusion ของแบคทีเรียชนิดนี้ พบว่า มีโซนการยับยั้ง *E. coli* 0157:H7 และ *S. aureus* TISTR 118 ขนาด 28.70±0.60 และ 25.40±0.94 มิลลิเมตร ตามลำดับ การศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้ง (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) พบว่า ความเข้มข้นต่ำสุดของ *B. amyloliquefaciens* B19 ที่ยับยั้ง *E. coli* 0157:H7 คือ 10^4 cfu/ml โดยแสดงบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 11.50±0.00 มิลลิเมตร และ MIC ของ *S. aureus* TISTR 118 คือ 10^6 cfu/ml แสดงบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 16.20±1.77 มิลลิเมตร เมื่อนำมาทดสอบการแตกของเม็ดเลือดแดงพบว่า *B. amyloliquefaciens* B19 ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงในอาหารที่มีเลือดแกะผสมแตก ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงถึงความเป็นไปได้ในการนำ *B. amyloliquefaciens* B19 ไปควบคุมแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

คำสำคัญ : *Bacillus* spp. การยับยั้งแบคทีเรีย แบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

*Corresponding Author, e-mail: saijai.k@yru.ac.th

Abstract

The aim of this research was to study the antibacterial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* B17, *Bacillus amyloliquefaciens* B19, *Bacillus pumilus* B21 and *Bacillus subtilis* B25 against 5 species of foodborne pathogen including *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella* Typhimurium TISTR 292 and *Salmonella* Typhimurium S003. Of four *Bacillus* strains, *B. amyloliquefaciens* B19 showed the potential antibacterial activity against *E. coli* ATCC 8439, *E. coli* 0157:H7, *S. aureus* TISTR 118 and *Salmonella* Typhimurium TISTR 292 by agar spot diffusion. The highest antibacterial activity was shown against *E. coli* 0157:H7 and *S. aureus* TISTR 118. *B. amyloliquefaciens* B19 inhibited the growth of *E. coli* 0157:H7 and *S. aureus* TISTR 118 with the inhibition zones of 28.70±0.60 and 25.40±0.94 mm, respectively by agar well diffusion. The Minimum inhibitory concentration (MIC) of *B. amyloliquefaciens* B19 against *E. coli* 0157:H7 was 10^4 cfu/ml with inhibition zone of 11.50±0.00 mm while the MIC against *S. aureus* TISTR 118 was 10^6 cfu/ml with inhibition zone of 16.20±1.77 mm. Furthermore, *B. amyloliquefaciens* B19 was tested for red blood cell hydrolysis. The result showed that it could not hydrolyze the sheep red blood cell. These results suggested that *B. amyloliquefaciens* could be used for foodborne pathogen control.

Keywords: *Bacillus* spp., Antibacterial activity, Foodborne pathogens

บทนำ

แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ บางครั้งพบเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในสิ่งมีชีวิต เช่น ทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ เนื่องจากมีเอนโดสปอร์ทำให้มีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อน และสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่างๆ ได้ดี สามารถเจริญได้ในทุกสภาวะแวดล้อม จึงสามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนได้ไม่ยาก *Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ได้รับการพิจารณาว่าเป็นแบคทีเรียที่มีความปลอดภัยสูงต่อมนุษย์และสัตว์ (GRAS: Generally recognized as safe organisms) มีสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก เนื่องจากพบว่า สามารถทนต่อสภาวะการเป็นกรด-ด่างของระบบทางเดินอาหารสิ่งมีชีวิต สามารถเข้ายึดเกาะและเจริญในลำไส้ใหญ่ของทั้งมนุษย์และสัตว์ สามารถกระตุ้นระบบภูมิต้านทานในเจ้าบ้าน

(Host) อีกทั้งยังสามารถผลิตสารต้านจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ได้แก่ Bacitracin, Subtilin, Coagulin subpeptin และ Polymyxin เป็นต้น เป็นผลให้มีการนำแบคทีเรียนี้ไปใช้เพื่อการควบคุมและยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในสัตว์และพืชหลายชนิด ตัวอย่างในพืช เช่น ควบคุมโรคกาบใบแห้งในข้าว โรครากเน่าโคนเน่าในทุเรียน โรคเหี่ยวเขียวในพริก มะเขือ ยาสูบ โรคใบจุดสีม่วงในต้นหอม โรคหัวเน่าเละในพืชพวกขิง ข่า โรคยางไหลในแตง เป็นต้น (กุศล ถมมา และพิศาล ศิริธร, 2555) ตัวอย่างการใช้ในสัตว์ เช่น ใช้ในการควบคุมโรคในปลาเรนโบว์เทร้า (Kamgar et al., 2013) และปลานิล (Aly et al., 2008) เป็นต้น

แบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* เป็นจุลินทรีย์สำคัญที่ก่อโรคทางเดินอาหารของมนุษย์ โดย *S. aureus* สร้างสารพิษ Enterotoxin ที่ทนต่อความร้อนได้ดีมาก หรือเชื้อ *E. coli* O157: H7 ซึ่งเป็นแบคทีเรียสาเหตุการระบาดของโรคอาหารเป็นพิษในหลายประเทศทั่วโลก ผู้ติดเชื้อจะมีอาการท้องเสียถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ หรืออาการลำไส้ใหญ่อักเสบมีเลือดออก (*Haemorrhagic colitis,* HC) โดยเฉพาะเด็กเล็กและผู้สูงอายุมีความเสี่ยงสูงที่จะเกิดอาการ Haemolytic uremic syndrome (HUS) ตามมา ทำให้เสียชีวิตได้ ปัจจุบันโรคทางเดินอาหารที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์นั้นยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญ จากการสำรวจขององค์กรอนามัยโลกในปี ค.ศ. 2000 พบว่ามีผู้ป่วยกว่า 2 ล้านคนเสียชีวิตจากโรคท้องร่วง โดยพบว่าสาเหตุสำคัญเกิดจากการปนเปื้อนของ *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. (WHO, 2000) สำหรับในประเทศไทยโรคอุจจาระร่วงก็ยังเป็นปัญหาลำดับต้นๆ และเพื่อลดวิธีการรักษาโรคติดเชื้อโดยใช้สารปฏิชีวนะ เนื่องจากพบว่าประเทศไทยมีปัญหาเชื้อโรคดื้อยามากขึ้น สาเหตุหลักเกิดจากการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างไม่เหมาะสม โดยมีรายงานว่า *E. coli* และ *S. aureus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ดื้อยาที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารซึ่งพบบ่อยในประเทศไทย มีการติดเชื้อดื้อยาปฏิชีวนะปีละกว่า 100,000 คน และในปี 2553 มีค่ายาปฏิชีวนะที่ใช้รักษาเชื้อดื้อยาจะมีมูลค่าประมาณ 2,539-6,084 ล้านบาท (สำนักงานวิเทศและประชาสัมพันธ์ กระทรวงสาธารณสุข, 2556) ดังนั้นหากพบว่า *Bacillus* spp. สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในทางเดินอาหารได้ ก็จะเป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนานำแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์อาจจะในลักษณะการพัฒนาเป็นเชื้อผงแห้ง หรือรูปแบบอื่นๆ สำหรับเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ ช่วยเสริมสร้างระบบภูมิต้านทานของร่างกาย ยับยั้งและกำจัดจุลินทรีย์ก่อโรค ป้องการการติดเชื้อและเจ็บป่วยด้วยโรคระบบทางเดินอาหาร และลดการใช้ยาปฏิชีวนะในอนาคต

Bacillus amyloliquefaciens B17, *Bacillus amyloliquefaciens* B19, *Bacillus pumilus* B21 และ *Bacillus subtilis* B25 ซึ่งคัดแยกได้จากลำไส้กุ้งกุลาดำ ผ่านการวิจัย พบว่า เชื้อนี้มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio harveyi*, *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus*

สายพันธุ์ที่ก่อโรคในกุ้งกุลาดำ (Domrongpokkaphan and Wanchaitanawong, 2006) และจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ของผู้วิจัย (รอการตีพิมพ์) พบว่า *B. subtilis* BA04 หรือ *B. subtilis* B25 สามารถยับยั้ง *Streptococcus agalactiae*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* สายพันธุ์ที่ก่อโรคในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ดังนั้นจึงมีแนวโน้มว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ด้วย งานวิจัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์การยับยั้งของแบคทีเรียกลุ่มก่อโรคในอาหาร เพื่อใช้เป็นแนวทางในการใช้แบคทีเรียนี้เป็นสารเสริมเพื่อป้องกันและควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของ *Bacillus* spp.

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แบคทีเรีย

1.1 *Bacillus amyloliquefaciens* B17, *Bacillus amyloliquefaciens* B19, *Bacillus pumilus* B21 และ *Bacillus subtilis* B25 ซึ่งคัดแยกมาจากทางเดินอาหารของของกุ้งกุลาดำ และได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella* Typhimurium TISTR 292 และ *Salmonella* Typhimurium S003 ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การเตรียมกล้าเชื้อของ *Bacillus* spp.

ถ่าย *B. amyloliquefaciens* B17, *B. amyloliquefaciens* B19, *B. pumilus* B21 และ *B. subtilis* B25 จำนวน 1 โคโลนี จาก stock culture ลงในอาหารเหลว BHI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง โดยมีการเขย่าความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง โดยทำการเพาะเลี้ยงซ้ำ 2 รอบ จะได้เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 cfu/ml

3. การเตรียมกล้าเชื้อของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยถ่าย *E. coli* ATCC 8439, *E. coli* 0157:H7, *S. aureus* TISTR 118, *Salmonella* Typhimurium TISTR 292 และ *Salmonella* Typhimurium S003 จำนวน 1 โคโลนี จาก Stock culture ลงในอาหารเหลว Nutrient บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง โดยทำการเพาะเลี้ยงซ้ำ 2 รอบ จะได้เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 cfu/ml

4. การทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

4.1 วิธี Agar spot diffusion

การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Agar spot diffusion ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดกล้าเชื้อในข้อ 2 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารแข็ง BHI ในจานเพาะเชื้อจำนวน 3 ตำแหน่ง ให้ห่างกันตำแหน่งละประมาณ 3 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเททับผิวหน้าด้วยอาหารกึ่งแข็ง ปริมาตรอาหาร 7 มิลลิลิตร ซึ่งมีแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่เตรียมตามวิธีในข้อ 3 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง วัดผลการยับยั้งของ *Bacillus* spp. โดยวัดบริเวณการยับยั้ง (inhibition zone) จากขอบโคโลนี มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร แต่ละการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง

4.2 วิธี Agar well diffusion

การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Agar well diffusion อ้างอิงตามวิธีของ Domrongpokkaphan and Wanchaitanawong (2006) ทำโดยนำแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ตามที่เตรียมในข้อ 4 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารแข็ง BHI ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในจานเพาะเชื้อผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ให้แข็งประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้น ใช้ที่เจาะวุ้น (เบอร์ 4 เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 มิลลิเมตร) เจาะวุ้นในจานๆ ละ 3 ตำแหน่ง ห่างกันประมาณตำแหน่งละ 3 เซนติเมตร หยดกล้าเชื้อของ *Bacillus* spp. ที่เพาะเลี้ยงตามวิธีในข้อ 3 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะไว้ รวม 2 หลุม โดย หยดอาหารเหลว BHI ในหลุมควบคุม 1 หลุม วางทิ้งไว้ประมาณ 30-60 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้งมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร

5. การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *Bacillus* spp. ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย อินดิเคเตอร์ โดยวิธี Agar well diffusion

การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) ของ *Bacillus* spp. ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ อ้างอิงตามวิธีของ Domrongpokkaphan and Wanchaitanawong (2006) โดยการเจือจาง *Bacillus* spp. ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ให้มีปริมาณแบคทีเรียความเข้มข้น 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3 cfu/ml แล้วเติมลงหลุม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตามวิธีข้อ 4.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการยับยั้งมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร และกำหนดให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *Bacillus* spp. ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์คือความเข้มข้นต่ำสุดของ *Bacillus* spp. ที่พบบริเวณการยับยั้ง

6. การทดสอบการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง โดย *Bacillus* spp.

นำกล้าเชื้อในข้อ 2 ไปเพาะเลี้ยงโดยวิธีการเกลี่ยบนอาหาร ที่มีส่วนผสมของเลือดแกะ (Blood agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการสร้างบริเวณใสรอบโคโลนีของ *Bacillus* spp.

7. การวิเคราะห์ข้อมูลและสถิติที่ใช้

วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย ANOVA ที่ความเชื่อมั่น $P < 0.05$ ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยทรีทเมนต์ด้วย Duncan's multiple range tests โดยโปรแกรม SPSS

ผล

1. ผลการคัดเลือก *Bacillus* spp. ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

ผลการคัดเลือก *Bacillus* spp. 4 ชนิด ได้แก่ *B. amyloliquefaciens* B17, *B. amyloliquefaciens* B19, *B. pumilus* B21 และ *B. subtilis* B25 ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ซึ่งก่อโรคทางเดินอาหารจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *E. coli* ATCC 8439, *E. coli* 0157:H7, *S. aureus* TISTR 118, *Salmonella* Typhimurium S003 และ *Salmonella* Typhimurium TISTR 292 เบื้องต้นโดยวิธี Agar spot diffusion พบว่า *B. amyloliquefaciens* B19 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์สูงสุด โดยยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ถึง 4 ชนิด คือ *E. coli* ATCC 8439, *E. coli* 0157:H7, *S. aureus* TISTR 118 และ *Salmonella* Typhimurium TISTR 292 โดยแสดงบริเวณการยับยั้ง *E. coli* 0157:H7 และ *S. aureus* TISTR 118 ได้สูงที่สุด มีขนาดของบริเวณการยับยั้งเท่ากับ 5.00±0.95 และ 4.90±0.10 มิลลิเมตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม *B. amyloliquefaciens* B19 ไม่แสดงการยับยั้ง *Salmonella* Typhimurium S003 นอกจากนั้นพบว่า *B. subtilis* B25 สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ATCC 8439 ได้เช่นกัน แต่ไม่แสดงการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์อีก 4 ชนิด แบคทีเรียอีกสองชนิดคือ *B. amyloliquefaciens* B17 และ *B. pumilus* B21 ไม่พบว่ามีการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 5 ชนิด (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1) เนื่องจาก *B. amyloliquefaciens* B19 ยับยั้ง *E. coli* 0157:H7 และ *S. aureus* TISTR 118 โดยให้ค่าบริเวณการยับยั้งสูง ดังนั้น จึงทดสอบการยับยั้งของแบคทีเรียชนิดนี้กับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์สองชนิดนี้อีกครั้งโดยใช้วิธี Agar well diffusion พบบริเวณการยับยั้งขนาด 28.70±0.60 และ 25.40±0.94 มิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 2)

เนื่องจาก *B. amyloliquefaciens* B19 ยับยั้ง *E. coli* 0157:H7 และ *S. aureus* TISTR 118 โดยให้ค่าบริเวณการยับยั้งสูงมาก ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียนี้เพื่อศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้ง (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) โดยใช้วิธี Agar well diffusion ต่อไป

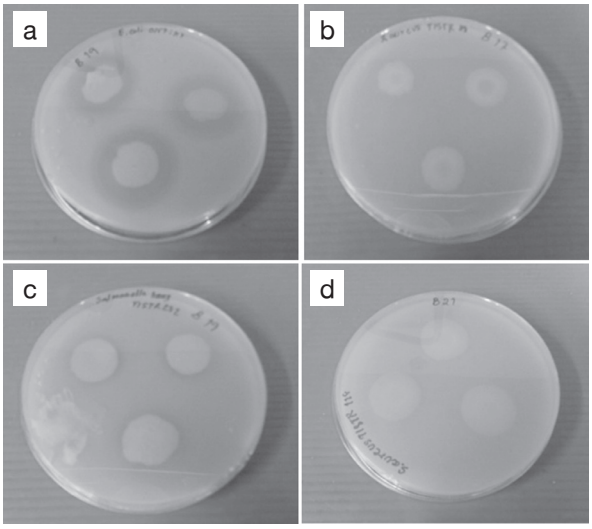
ตารางที่ 1 การยับยั้งของ *Bacillus* spp. ต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยวิธี Agar spot diffusion

Bacillus **spp.**	**ขนาดของบริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร) ±SD**				
	E. coli **ATCC 8439**	***E. coli*** **0157:H7**	***Salmonella*** **Typhimurium S003**	***Salmonella*** **Typhimurium TISTR 292**	***S. aureus*** **TISTR 118**
B17	-	-	-	-	-
B19	1.63±0.15[b]	5.00±0.95[a]	-	1.97±0.50[b]	4.90±0.10[a]
B21	-	-	-	-	-
B25	1.50±0.17	-	-	-	-

หมายเหตุ: - หมายถึง ไม่มีบริเวณใสที่แสดงการยับยั้ง
อักษร a และ b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น $P<0.05$ ของบริเวณ การยับยั้ง ของ *Bacillus* แต่ละชนิดกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

ตารางที่ 2 การยับยั้ง ของ *B. amyloliquefaciens* B19 ต่อ *E. coli* 0157:H7 และ *S. aureus* TISTR 118 โดยวิธี Agar well diffusion

Bacillus **spp.**	**ขนาดของบริเวณการยับยั้ง (มิลลิเมตร) ±SD**	
	E. coli **0157:H7**	***S. aureus*** **TISTR 118**
B. amyloliquefaciens B19	28.70±0.60	25.40±0.94



ภาพที่ 1 การยับยั้งการเจริญของ (a) *B. amyloliquefaciens* B19 ต่อ *E. coli* 0157:H7 (b) *B. amyloliquefaciens* B17 ต่อ *S. aureus* TISTR 118 (c) *B. amyloliquefaciens* B19 ต่อ *Salmonella* Typhimurium TISTR 292 และ (d) *B. pumilus* B21 ต่อ *S. aureus* TISTR 118 โดยวิธี Agar spot diffusion

2. ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *Bacillus* spp. ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยวิธี Agar well diffusion

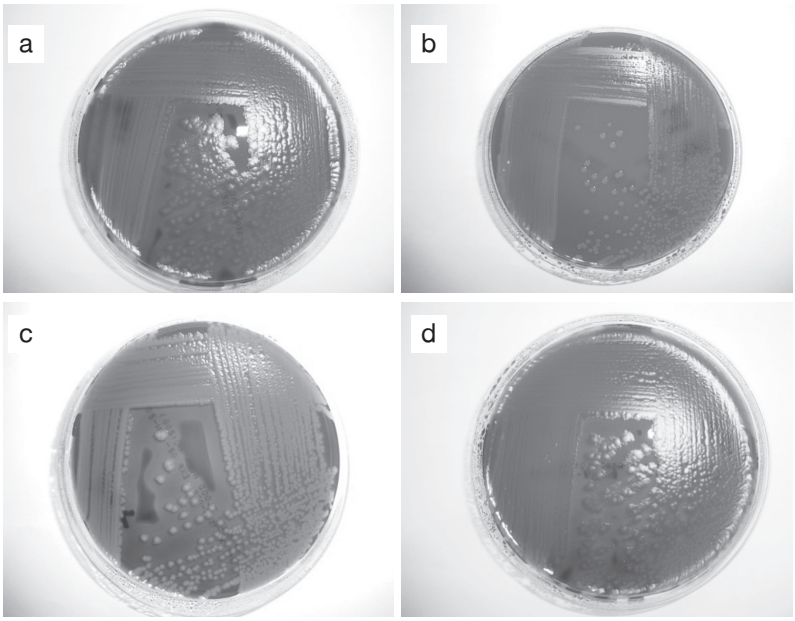
ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *Bacillus* spp. ต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* 0157:H7 และ *S. aureus* TISTR 118 ที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml แสดงดังตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *B. amyloliquefaciens* B19 ที่ยับยั้ง *E. coli* 0157:H7 ได้คือ 10^4 cfu/ml ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้ง *S. aureus* TISTR 118 คือ 10^6 cfu/ml และมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 11.50±0.00 และ 16.20±1.77 มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10^8 cfu/ml ค่าการยับยั้ง *E. coli* 0157:H7 และ *S. aureus* TISTR 118 เพิ่มขึ้นเป็น 28.63±3.41และ 26.53±3.99 มิลลิเมตร ตามลำดับ ทั้งนี้ Domrongpokkaphan and Wanchaitanawong (2006) รายงานผลยับยั้งการเจริญของ *B. amyloliquefaciens* B19 ต่อ *Vibrio haveyi*, *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* เมื่อ *B. amyloliquefaciens* B19 มีความเข้มข้น $5x10^5$ cfu/ml พบค่าบริเวณยับยั้งเท่ากับ 11.00±0.00 ถึง 13.30±0.04 มิลลิเมตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น $5x10^7$ cfu/ml มีค่าบริเวณยับยั้งเพิ่มขึ้นเป็น 15.50±0.14 ถึง 13.30±0.04 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *B. amyloliquefaciens* B19 ที่ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* 0157:H7 และ *S. aureus* TISTR 118 โดยวิธี Agar well diffusion

ความเข้มข้นของ *B. amyloliquefaciens* B19 (cfu/ml)	**ขนาดของบริเวณการยับยั้งต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (มิลลิเมตร)±SD**	
	***E. coli* 0157:H7**	***S. aureus* TISTR 118**
10^8	28.63±3.41	26.53±3.99
10^7	27.00±3.10	21.30±1.80
10^6	24.67±3.69	16.20±1.77
10^5	19.53±1.02	-
10^4	11.50±0.00	-
10^3	-	-

3. การแตกตัวของเม็ดเลือดแดง โดย *Bacillus* spp.

ผลการทดสอบการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงพบว่า *B. amyloliquefaciens* B19 ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ในขณะที่ *Bacillus* อีกสามชนิดย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบเบต้า (ß-haemolysis) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การย่อยเม็ดเลือดแดงของ (a) *B. amyloliquefaciens* B17 (b) *B. amyloliquefaciens* B19 (c) *B. pumilus* B21 (d) *B. subtilis* B25

อภิปรายผล

แบคทีเรียจีนัส *Bacillus* เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารเมตาบอไลท์หลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้ จากผลการทดลองพบว่า *B. amyloliquefaciens* B19 ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในอาหารได้หลายชนิด ทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก สอดคล้องกับรายงาน Yilmaz et al. (2006) ซึ่งพบว่า *B. cereus* M15 ยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก ผลการทดสอบค่าความเข้มข้นต่ำสุดต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *E. coli* 0157:H7 และ *S. aureus* TISTR 118 ที่ระดับความเข้มข้น 10^6 cfu/ml พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *B. amyloliquefaciens* B19 คือ 10^4 และ 10^6 cfu/ml ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการทดลองของ Domrongpokkaphan and Wanchaitanawong (2006) ที่รายงานค่าความเข้มข้นต่ำสุดของ *B. amyloliquefaciens* B19 เท่ากับ $5x10^5$ cfu/ml จึงจะส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *V. haveyi*, *V. alginolyticus* และ *V. parahaemolyticus* แม้ว่าในการทดลองนี้ไม่ได้ทดสอบหาสาเหตุการยับยั้งของ *Bacillus* spp. อย่างไรก็ตามการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์นี้อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างในอาหาร สารประกอบอินทรีย์ระเหย (Volatile compounds) และสารเมแทบอไลท์ต่างๆ เช่น Bacitracin, Gramicidin S, Polymyxin, and Tyrotricidin (Balca´zar and Rojas-Luna, 2007; Yilmaz et al. 2006) ซึ่งสารยับยั้งอาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิต

องค์ประกอบของสาร คุณสมบัติทางเคมี และสภาพอาหารที่ใช้ จากการที่ *B. amyloliquefaciens* B19 ยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีโดยใช้ความเข้มข้นต่ำจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้งานจริง นอกจากนั้นการที่แบคทีเรียนี้สามารถสร้างเอนโดสปอร์ที่มีความทนทาน และอยู่รอดได้ดีในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาวะขาดแคลนสารอาหาร ความร้อนสูง แห้ง และสารเคมีต่างๆ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียนี้จะมีความอยู่รอดสูงเมื่อผ่านกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรม

การทดสอบการย่อยเม็ดเลือดแดงของแบคทีเรียเพื่อพิสูจน์ว่าแบคทีเรียนั้นสร้างโปรตีนฮีโมไลซินออกมาย่อยเม็ดเลือดแดงหรือไม่ แบคทีเรียที่ให้ผลเป็นลบคือ *B. amyloliquefaciens* B19 ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง แสดงถึงความปลอดภัยของการนำแบคทีเรียนี้ไปใช้กับมนุษย์และสัตว์

สรุป

การศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารของ *B. amyloliquefaciens* B17, *B. amyloliquefaciens* B19, *B. pumilus* B21 และ *B. subtilis* B25 พบว่า *B. amyloliquefaciens* B19 แสดงความสามารถสูงสุดในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* 0157:H7 และ *S. aureus* TISTR 118 โดยใช้ความเข้มข้นของ *B. amyloliquefaciens* B19 เพียง 10^4 และ10^6 cfu/ml ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ไม่ย่อยเม็ดเลือดแดง แสดงถึงความปลอดภัยในการนำแบคทีเรียนี้ไปใช้กับมนุษย์และสัตว์ ทั้งนี้ในการทดสอบต่อไปควรจะวิเคราะห์คุณสมบัติของสารยับยั้งที่ *B. amyloliquefaciens* B19 ผลิต

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา ที่สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กุศล ถมมา และพิศาล ศิริธร. (2555). ผลของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus subtilis* B006 ในการเคลือบเมล็ดเพื่อควบคุมเชื้อรา *Botryosphaeria rhodina* สาเหตุโรคยางไหลของแตง. *Khon Kaen Agricul. J.*, *40,* 53-60.

สำนักงานวิเทศและประชาสัมพันธ์ กระทรวงสาธารณสุข. (2556). *สถานการณ์เชื้อดื้อยาปฏิชีวนะในไทย* [ออนไลน์]. ค้นเมื่อ 9 ตุลาคม 2557, จาก : http://narst.dmsc.moph.go.th/news001.html

Aly, S. M., Abdel-Galil Ahmed, Y., Abdel-Aziz Ghareeb, A. and Mohamed, M. F. (2008). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immunol*, *25*(1-2), 128-136.

Balcázar, J. L. and Rojas-Luna, T. (2007). Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Cur. Microbiol*, *55*(5), 409-412.

Domrongpokkaphan, V. and Wanchaitanawong, P. (2006). *In vitro* antimicrobial activity of *Bacillus* spp. against pathogenic *vibrio* spp. in black tiger shrimp (*penaeus monodon*). *Kasetsart J.* (*Nat.Sci.*), *40*, 949-957.

Kamgar, M., Pourgholam, R., Ghiasi, M. & Ghane, M. (2013). Studies on *Bacillus subtilis*, as potential probiotics, on the biochemical parameters of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to challenge infections. *Adv. Studies Biol*, *5*, 37-50.

Yilmaz, M., Soran, H. & Beyatli, Y. (2006). Antimicrobial activities of some *Bacillus* spp. strains isolated from the soil. *Microbiological Res.*, *161*(2), 127-131.

WHO. (2000). *Global Water Supply and Sanitation Assessment*. [ออนไลน์]. ค้นเมื่อ 7 ตุลาคม 2557, จาก : www.who.int/water_sanitation_health/monitoring/jmp2000.pdf