ศักยภาพความเป็นโปรไบโอติกของ *Bifidobacterium* spp. สายพันธุ์ที่แยกได้จากเด็กทารก ไก่และสุกร

สังวาลย์ หาญกล้า

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
มิถุนายน 2560
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ สังวาลย์ หาญกล้า ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ดร.พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ เกรียงศักดิ์ พูนสุข)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน
(ดร.เสาวภา เขียนงาม)

.....กรรมการ
(ดร.พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ เกรียงศักดิ์ พูนสุข)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสาตรี คงเจริญสุนทร)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)
วันที่ ธ เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2560

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความและกรุณาจากคณาจารย์หลาย ๆ ท่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ดร.พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลักที่ให้ความรู้ ให้คำปรึกษา แนวทางการทำงาน และที่สำคัญรับเป็นลูกศิษย์โดยที่ไม่รู้จักมาก่อนจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ เกรียงศักดิ์ พูนสุข อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่จุดประกายให้มาศึกษาต่อ และมอบความรู้ คำแนะนำและแนวทางในการทำงานจนทำให้งานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิสาตรี คงเจริญสุนทร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้เสียสละเวลาและกรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติมทำให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นและที่สำคัญคือดูแลลูกศิษย์คนนี้ตั้งแต่ปริญญาตรีจนถึงปริญญาโท

ขอบคุณ ดร.เสาวภา เขียนงาน ประธานคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาเสียสละเวลาและเดินทางมาสอบ รวมถึงให้คำแนะนำต่าง ๆ ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์ไพรัช ธิติศักดิ์ ประธานกรรมการ บริษัท เค.เอ็ม.พี. ไบโอเทค จำกัด ที่ให้ความกรุณาในการให้เวลาสำหรับโอกาสในการศึกษาต่อ ให้ความอนุเคราะห์เรื่องค่าใช้จ่ายในการทำวิจัยไม่ว่าจะเป็นสารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ อุปกรณ์ต่าง ๆ รวมถึงอนุญาตให้ใช้ห้องปฏิบัติการของบริษัทในการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ ครอบครัวหาญกล้าและครอบครัวบุญล้อม ที่คอยให้กำลังใจและความห่วงใยตลอดมา ที่ขาดไม่ได้คือขอบคุณ ด.ญ.พูนสุข บุญล้อม ที่เป็นแรงผลักดันที่สำคัญยิ่งให้มีกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์นี้ให้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและกำลังใจระหว่างเรียนและทำวิทยานิพนธ์และมอบมิตรภาพอันดียิ่งตลอดมา

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้โอกาสในการศึกษาในครั้งนี้ ทำให้มีโอกาสพบคนเก่งและคนดี ได้ความรู้ไปช่วยพัฒนาในการทำงานต่อไป

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บิดามารดา บูรพาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

สังวาลย์ หาญกล้า

55910374: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์ชีวภาพ; วท.ม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)
คำสำคัญ: *Bifidobacterium* spp./ โปรไบโอติก/ เด็กทารก/ ไก่/ สุกร

สังวาลย์ หาญกล้า: ศักยภาพความเป็นโปรไบโอติกของ *Bifidobacterium* spp. สายพันธุ์ที่แยกได้จากเด็กทารก ไก่ และสุกร (PROBIOTIC POTENTIAL OF *Bifidobacterium* spp. ISOLATED FROM INFANTS, CHICKENS AND SWINES) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์, วท.ด., เกรียงศักดิ์ พูนสุข, สพ.บ. 175 หน้า. ปี พ.ศ. 2560.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยก *Bifidobacterium* spp. จากอุจจาระเด็กทารก ลำไส้ไก่และสุกร (น้ำนมแม่สุกร มูลลูกสุกรและมูลแม่สุกร) ตลอดจนการจัดจำแนกและศึกษาคุณสมบัติโปรไบโอติกของ *Bifidobacterium* spp. ที่คัดแยกได้ พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้จำนวน 16 ไอโซเลท จากอุจจาระเด็กทารกจำนวน 10 ไอโซเลท มูลลูกสุกรและมูลแม่สุกรจำนวน 6 ไอโซเลท ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่ได้ใกล้เคียงกับ *Bifidobacterium* spp. ด้วย ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับยีน 16S rRNA ของ *B. animalis* subsp. *lactis* 99-100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาคุณสมบัติโปรไบโอติกของ *B. animalis* subsp. *lactis* ทั้ง 16 สายพันธุ์ พบว่ามี *B. animalis* subsp. *lactis* ที่มีศักยภาพสำหรับการพัฒนาเพื่อนำไปใช้เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติก จำนวน 4 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01, H9-02 และ P8-S01 เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ทั้งในสภาวะที่เป็นกรดที่ค่า pH 2 ในสภาวะที่มี pepsin 0.3 เปอร์เซ็นต์ ได้นานสูงสุด 4 ชั่วโมง และในสภาวะที่มีน้ำดีที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ได้นานสูงสุด 4 ชั่วโมง มีความสามารถในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้อยู่ในระดับสูงและสามารถทนอุณหภูมิได้สูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ไอโซเลท P8-S01 ซึ่งคัดแยกได้จากสุกรมีลักษณะเด่น คือ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน

55910374: MAJOR: FACULTY OF SCIENCE; MS.C. (BIOLOGICAL SCIENCE)
KEYWORDS: *Bifidobacterium* spp./ PROBIOTICS/ INFANTS/ CHICKENS/ SWINES

SUNGWARN HANKLA: PROBIOTIC POTENTIAL OF *Bifidobacterium* spp. ISOLATED FROM INFANTS, CHICKENS AND SWINES. ADVISORY COMMITTEE: PATCHARANAN AMORNRATTANAPAN, Ph.D., KRIENGSAK POONSUK, D.V.M. 175 P. 2017.

This research aimed to isolate *Bifidobacterium* spp. from infant feces, chicken's intestines, swine's milk and swine's feces, Isolated strains ware identified and probiotics properties were characterited. Total number of 16 isolates inherited morphological and biochemical characteristics of *Bifidobacterium* spp. sequencing analysis of 16s rRNA from those 16 isolates demonstrated shared 99-100% of 16s rRNA sequence similarity to *B. animalis* subsp. *lactis*. Investigation of probiotic properties of 16 strains of *B. animalis* subsp. *lactis* revealed 4 potential strains (H1-05, H9-01, H9-02 and P8-S01) that had the best characteristics of probiotic as follow; % survival of over 85% after 4 hours of exposure in both acidic (pH 2.0 with 0.3% pepsin) and 1% oxgall bile conditions, high adherence efficiency on chicken's intestinal mucus membrane and ability to survive at 60^{O}C. In addition, strain P8-S01 that was isolated from swine sample was able to grow in aerobic condition.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

สารบัญ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญภาพ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

สมมติฐานการวิจัย..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

ขอบเขตของการวิจัย..... 4

นิยามศัพท์เฉพาะ..... 4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5

โปรไบโอติก..... 5

Bifidobacterium spp..... 16

การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกในอาหารสัตว์..... 25

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 26

3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 32

เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี..... 32

เชื้อจุลินทรีย์..... 37

ตัวอย่างที่ศึกษา..... 38

การเก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp. และการเก็บรักษาแบคทีเรียที่คัดแยกได้..... 38

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีและอื่น ๆ 41

การสกัดดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ..... 45

การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ..... 48

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย	55
การคัดแยกและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Bifidobacterium* spp.	56
การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและอื่น ๆ	58
การจัดจำแนก *Bifidobacterium* spp. โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA	60
การศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ	70
5 สรุปและอภิปรายผล	92
อภิปรายผล	92
สรุปผลการวิจัย	101
ข้อเสนอแนะ	101
บรรณานุกรม	103
ภาคผนวก	113
ภาคผนวก ก	114
ภาคผนวก ข	129
ภาคผนวก ค	133
ภาคผนวก ง	135
ภาคผนวก จ	147
ประวัติย่อของผู้วิจัย	175

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2-1 เชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารสัตว์…..... 8

2-2 รายชื่อของจุลินทรีย์ที่ระบุให้อยู่ในกลุ่ม “สารเสริมชีวนะ” ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2559..... 11

2-3 การสังเคราะห์วิตามินของ *Bifidobacterium* spp. 19

2-4 แหล่งที่อยู่อาศัยของ Genus *Bifidobacterium* spp. ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์..... 20

2-5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระบบทางเดินอาหารของไก่..... 24

3-1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Bifidobacterium* spp..…... 42

3-2 ไพรเมอร์ Bif164-f และ Bif662-r ……..... 46

3-3 Master mix สำหรับปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ไพเมอร์ Bif164-f และ Bif662-r 46

4-1 จำนวนตัวอย่างที่คัดแยกได้……..... 55

4-2 สรุปผลการทดสอบและเปอร์เซ็นต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างทั้งหมด 58

4-3 ชิ้นดีเอ็นเอ contigs ของยีน 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp. จำนวน 16 ไอโซเลท……..... 63

4-4 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากไอโซเลทที่คัดแยกจากตัวอย่างอุจจาระเด็กทารก โดยใช้โปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล NCBI……..…... 64

4-5 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากไอโซเลทที่คัดแยกจากตัวอย่างสุกร โดยใช้โปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล NCBI…….. 68

4-6 ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก……..... 80

4-7 ความไวต่อยาต้านจุลชีพของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก……..... 85

4-8 การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก……..... 88

4-9 การเปรียบเทียบคุณสมบัติโปรไบโอติกของ *B. animalis* subsp. *lactis* ที่คัดเลือกได้ 91

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	การเจริญของ *Bifidobacterium* spp. ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนที่แตกต่างกันในอาหารเหลว	18
2-2	ทางเดินอาหารของไก่.....	23
4-1	ลักษณะโคโลนีไอโซเลท ภาพ ก = C2-C02, ภาพ ข = C4-C01, ภาพ ค = H9-01 และภาพ ง = P1-P01 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Bifidobacterium medium (BM agar) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง……..…	56
4-2	ลักษณะเซลล์ที่ผ่านการย้อมแกรม (Gram's stain) ของ *Bifidobacterium* spp. ไอโซเลท ภาพ ก=H9-01, ภาพ ข = H1-05, ภาพ ค = P1-P01 และภาพ ง = P9-P01 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Bifidobacterium medium (BM agar) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (กำลังขยาย 100 เท่า).....	57
4-3	ผลการทดสอบชีวเคมีของการทดสอบการเคลื่อนที่ (motility test) ……	58
4-4	ผลการทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรต …….	59
4-5	ผลการทดสอบการใช้น้ำตาลกลูโคส ……	59
4-6	ผลการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ ด้วยวิธี PCR.....	61
4-7	ผลการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ ด้วยวิธี PCR.....	61
4-8	ผลการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ ด้วยวิธี PCR.....	62
4-9	ผลการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ ด้วยวิธี PCR.....	62
4-10	ความสามารถในการทนกรดที่ pH 2 ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก.....	71
4-11	ความสามารถในการทนกรดที่ pH 3 ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก.....	71
4-12	ความสามารถในการทนกรดที่ pH 4 ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก.....	72

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-13 ความสามารถในการทนกรดที่ pH 5 ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก..... 72

4-14 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ pH ต่าง ๆ ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก..... 73

4-15 ความสามารถในการทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 0 เปอร์เซ็นต์ ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก..... 74

4-16 ความสามารถในการทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.30 เปอร์เซ็นต์ ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก..... 74

4-17 ความสามารถในการทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก..... 75

4-18 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในการทนน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก..... 75

4-19 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในการทนน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ *B. animalis* subsp. *lactis* ไอโซเลท H1-05, P4-S01, P8-S01 และ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527..... 76

4-20 ประสิทธิภาพในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก..... 77

4-21 ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก..... 78

4-22 ความสามารถในการทนอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก..... 81

4-23 ความสามารถในการทนอุณหภูมิที่ 52 องศาเซลเซียส ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก..... 81

4-24 ความสามารถในการทนอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก..... 82

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4-25 ความสามารถในการทนอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก..... 82

4-26 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของ *B. animalis* subsp. *lactis* ไอโซเลท H10-03 ต่อยา E, Erythromycin (15 µg); CT, Colistinn (10 µg) และ ENR, Enrofloxacin (5 µg)…….. 84

4-27 ขนาดบริเวณยับยั้งของ *B. animalis* subsp. *lactis* ไอโซเลท H9-03, H9-04 และ H9-05 ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 6538..... 89

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากแนวโน้มการส่งออกสินค้าปศุสัตว์ของไทยที่เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการฟื้นตัวของผลผลิตทางการเกษตรและการส่งเสริมของภาครัฐ รวมถึงปัจจัยแวดล้อมต่าง ๆ เช่น การยกเลิกการนำเข้าสินค้าไก่จากไทยของประเทศเกาหลีใต้ รวมถึงไข้หวัดนกที่กำลังแพร่ระบาดในหลายประเทศ (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2560) ทำให้ผู้ผลิตและเกษตรกรต้องเพิ่มปริมาณการผลิตให้สอดคล้องกับความต้องการของผู้บริโภค แต่ไทยยังพบปัญหาและอุปสรรคหลายอย่าง เช่น การระบาดของโรคในไก่ เนื่องจากมีสภาพอากาศร้อนชื้น โดยหลังจากเกิดการระบาดของโรคไข้หวัดนกรุนแรงในปี 2547 อุตสาหกรรมไก่แช่แข็งและแปรรูปของไทยได้รับผลกระทบอย่างหนักจากการระงับการนำเข้าของประเทศคู่ค้าที่สำคัญ เช่น สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น ฮ่องกง รัสเซีย และสิงคโปร์ (วิจัยกรุงศรี, 2560) ในส่วนของสุกรและผลิตภัณฑ์พบว่าไทยยังคงพบปัญหาเรื่องโรคปากเท้าเปื่อย โรคท้องร่วงติดต่อ (PED) โรคทางระบบสืบพันธุ์และระบบทางเดินหายใจ (PRRS) ซึ่งสร้างความเสียหายให้กับการผลิตสุกรเป็นอย่างมากในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา (ศูนย์วิจัยและพัฒนา ธ.ก.ส., 2559)

เนื่องจากอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ของไทยยังคงพบปัญหาและต้องเฝ้าระวังโรคต่าง ๆ อย่างต่อเนื่อง รวมถึงความเสี่ยงจากสภาพอากาศที่แปรปรวน (วิจัยกรุงศรี, 2560) จากเดิมเกษตรกรจะแก้ไขปัญหาโดยการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อควบคุมโรคและเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต ซึ่งการใช้ยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์อาจมีสารตกค้างที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ เนื่องจากสัตว์ได้รับสารต้านจุลชีพเป็นเวลานานอาจทำให้เชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้เกิดการดื้อยา เกิดความไม่สมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ได้ ปัจจุบันเกษตรกรสนใจที่จะเลี้ยงสัตว์แบบปลอดยาปฏิชีวนะด้วยการหันมาใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติก (Probiotics) ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ เพื่อช่วยเสริมสร้างความแข็งแรง ลดปริมาณเชื้อก่อโรคในลำไส้ เพิ่มภูมิต้านทานและไม่มีสารตกค้างที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค (รินทร์ลภัส กุลพัชรคณาพงษ์, 2555)

ปัจจุบันหลายประเทศตระหนักถึงความปลอดภัยของผู้บริโภคเป็นหลัก โดยสินค้าที่ส่งออกต้องมีคุณภาพ มีความปลอดภัยและไม่พบสารตกค้าง การใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกจึงเป็นทางเลือกใหม่สำหรับเกษตรกร เพราะมีประโยชน์ในแง่ของการก่อให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร สร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคช่วยให้สัตว์มีสุขภาพดีขึ้น

(Williams, Verstegen, & Tamminga, 2001) นอกจากนี้แล้วจุลินทรีย์โปรไบโอติกยังช่วยให้สัตว์สามารถดูดซึมสารอาหารได้ดีขึ้น จุลินทรีย์กลุ่มที่นำมาใช้เป็นโปรไบโอติกมีหลายชนิด เช่น *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus, Saccharomyces* และ *Bifidobacterium* (Gaggia, Mattarelli, & Biavati, 2010)

Bifidobacterium ถูกพบครั้งแรกในอุจจาระเด็กทารกที่ดื่มนม เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน รูปร่างไม่แน่นอน มีกิ่งก้านคล้ายตัววี ตัววาย จัดเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน พบในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ พบมากในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีความพิเศษ คือ สามารถสร้างสารประกอบซึ่งกระตุ้นให้ร่างกายมีการสร้างระบบภูมิคุ้มกันขึ้น (Ventura, Elli, Reniero, & Zink, 2001) แบคทีเรียในจีนัส *Bifidobacterium* แตกต่างจากจีนัส *Lactobacillus* คือ *Bifidobacterium* spp. สามารถสร้างเอนไซม์ fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซส ในขณะที่ *Lactobacillus* ไม่สามารถสร้างได้ จึงเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการจำแนกเชื้อกลุ่มนี้ได้ (Lee and O' Sullivan, 2010) และยังสามารถทนต่อสภาวะกรดและด่างในระบบทางเดินอาหารจึงสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ได้ (Chung, Kim, Chum, & Ji, 1999) นอกจากนี้ *Bifidobacterium* spp. สามารถสร้างกรดแลคติกและกรดอะซิติกจากกระบวนการหมัก ในขณะที่จีนัส *Lactobacillus* สร้างกรดแลกติคเพียงอย่างเดียว (Garrity, 1986, pp.1208-1211) มีรายงานว่า *Bifidobacterium* spp. พบมากที่สุดในเด็กทารกช่วงอายุตั้งแต่แรกเกิดและพบมากสุดในอุจจาระทารกที่ดื่มนมแม่ (Arboleya et al., 2011) *Bifidobacterium* บางสายพันธุ์พบครั้งแรกในลำไส้มนุษย์ เช่น *B. longum, B. breve, B. bifidum, B. pseudocatenulatum* และ *B. adolescentis* (Matteuzzi, Crociani, & Zani, 1971) พบ *B. adolescentis* และ *B. longum* ในอุจจาระมนุษย์ (Bevilacqua, Ovidi, Mattia, Trovatelli, & Canganella, 2003) ส่วนสายพันธุ์ที่พบในลำไส้สุกร เช่น *B. suis* และ *B. choerinum* (Modesto et al., 2009) *B. thermophilum* พบในมูลแม่สุกรและพบ *B. boum*, *B. choerinum* ในมูลลูกสุกร (Maxwell, Duncan, Hold, & Stewat, 2004) พบ *B. gallinarum* ในไก่ (Turroni, Sindern, & Ventura, 2011) ในสัตว์บางชนิดพบสายพันธุ์ที่มีความเฉพาะเจาะจง เช่น *B. pullorum* และ *B. galinarum* พบในลำไส้ส่วน caecum ของไก่ (Matteuzzi, Crociani, & Zani, 1971)

การนำ *Bifidobacterium* spp. มาใช้เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกส่วนใหญ่ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารของมนุษย์ แต่ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ยังพบได้น้อยมากเนื่องจากมีความจำเพาะต่อการเจริญหลายอย่าง การนำ *Bifidobacterium* spp. มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์จำเป็นต้องมีการศึกษาคุณสมบัติที่นอกเหนือจากคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติก

เนื่องจากในกระบวนการผลิตจุลินทรีย์โปรไบโอติก เช่นการทำ spray drying หรือ freeze dried มีขั้นตอนที่ต้องสัมผัสกับออกซิเจนหรืออุณหภูมิสูง ซึ่งอาจส่งผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อได้ (Simpson, Stanton, Fitzgerald, & Ross, 2005)

ผู้วิจัยได้ดำเนินการตรวจสอบผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกหลายชนิดที่มีการจัดจำหน่ายและนำไปใช้เป็นสารผสมล่วงหน้าในอาหารสัตว์ไม่พบว่ามีแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacterium* spp. ผสมอยู่เลยทั้งที่มีปรากฏบนฉลากแนะนำสินค้า แต่ในผลิตภัณฑ์ที่ใช้สำหรับสัตว์จากต่างประเทศ โดยเฉพาะในสัตว์เลี้ยง สุนัขและแมว ปรากฏว่ามีการเติม *Bifidobacterium* spp. เป็นส่วนผสมอยู่ด้วย ผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญในการศึกษาเพื่อจำแนกและคัดเลือก *Bifidobacterium* spp. จากเด็กทารก ไก่และสุกรในประเทศไทย ซึ่งถือเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นเพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกสำหรับสัตว์แต่ละชนิดได้ โดยการศึกษาคุณสมบัติในด้านต่าง ๆ ของเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดแยกและจำแนกแบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp. จากเด็กทารก ไก่และสุกร
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกของ *Bifidobacterium* spp. ที่จำแนกและคัดเลือกได้ในห้องปฏิบัติการ

สมมติฐานการวิจัย

1. สามารถคัดแยกและจำแนกแบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp. ได้จากเด็กทารก ไก่และสุกร
2. แบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp. ที่จำแนกและคัดเลือกได้มีคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบข้อมูลเกี่ยวกับ *Bifidobacterium* spp. ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก ซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ เช่น การนำไปใช้ผสมในอาหารสัตว์เป็นต้น

ขอบเขตการวิจัย

1. คัดแยกและคัดเลือก *Bifidobacterium* spp. จากเด็กทารก (อุจจาระ), ไก่ (ลำไส้ไก่ส่วนลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) ลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) และลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (caecum), สุกร (น้ำนมแม่สุกร มูลของลูกสุกรและมูลของแม่สุกร) ตัวอย่างละ 10 ตัวอย่าง

2. ระบุแทกซอนของแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Bifidobacterium* spp. โดยวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA และทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกของ *Bifidobacterium* spp. ได้แก่ ความสามารถในการทนกรด ความสามารถในการทนน้ำดี ความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ ความไวต่อยาต้านจุลชีพ ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงและการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค

นิยามศัพท์เฉพาะ

โปรไบโอติก (Probiotics) หมายถึง จุลชีพมีชีวิตที่ให้เสริมเข้าไปจากภายนอกร่างกายในปริมาณที่เพียงพอจะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพร่างกาย (Morelli & Capurso, 2012)

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โปรไบโอติก

1.1 ความหมายของโปรไบโอติก

โปรไบโอติก (Probiotics) มาจากภาษากรีก แปลว่า “เพื่อชีวิต” (For life) ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกในรายงานการวิจัยของ Lilly และ Stillwell ในปี ค.ศ.1965 เพื่ออธิบายถึงสารชนิดหนึ่งที่ถูกขับออกมาจากจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง เมื่อนำมาเติมในอาหารจะช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ของเจ้าบ้าน (host) (Fuller, 1989) นอกจากนี้ยังมีผู้ให้ความหมายของโปรไบโอติก ดังนี้

โปรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อใช้ในปริมาณที่เพียงพอจะให้ประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน มีประโยชน์ในการรักษาสมดุลในลำไส้ รักษาความสมดุลในทางเดินอาหาร ช่วยให้ดูดซึมสารอาหารได้ดีขึ้น (Salminen, Isolauri, & Salminen, 1996)

โปรไบโอติก หมายถึง อาหารเสริมที่เป็นจุลชีพเล็ก ๆ ที่ยังมีชีวิต เมื่อรับประทานเข้าไปแล้วช่วยให้ร่างกายผู้นั้นมีสุขภาพดีขึ้น ซึ่งอาจป้องกันรักษาโรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของจุลชีพในร่างกาย ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่เคยมีในลำไส้สมัยเป็นเด็กทารก (อุทัย เก้าเอี้ยน, 2549)

โปรไบโอติก หมายถึง เชื้อแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์เมื่อสัตว์กินเข้าไปแล้วจะเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนในลำไส้ โดยใช้พลังงานจากคาร์โบไฮเดรตและผลิตกรดแลคติค วิตามินบีและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ช่วยปรับสภาพความเป็นกรดในทางเดินอาหารให้เหมาะสมกับการดำรงอยู่ของเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ส่งผลให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียก่อโรคลดลง (รินทร์ลภัส กุลพัชรคณาพงษ์, 2555)

โปรไบโอติก (Probiotics) หมายถึง จุลชีพมีชีวิตที่ให้เสริมเข้าไปจากภายนอกร่างกายในปริมาณที่เพียงพอจะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพร่างกาย (Morelli & Capurso, 2012)

จากที่มีผู้ให้ความหมายของโปรไบโอติกที่แตกต่างกันพอสรุปได้ว่า โปรไบโอติก (Probiotics) หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งอาจมีชนิดเดียวหรือเป็นส่วนผสมของจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถไปปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์ดั้งเดิมที่อาศัยอยู่ในลำไส้ มีประโยชน์ในการรักษาสมดุลในลำไส้ รักษาความสมดุลในทางเดินอาหาร ช่วยให้ดูดซึมสารอาหารได้ดีขึ้น ซึ่งนอกจากจะไปส่งเสริมการเจริญเติบโตแล้วยังทำให้คนหรือสัตว์สุขภาพดีขึ้น

1.2 บทบาทของโปรไบโอติก

แบคทีเรียที่มีการนำมาผลิตเป็นโปรไบโอติกที่สำคัญคือกลุ่ม *Lactobacillus* เช่น *L. plantarum, L. acidofhilus, L. rhamnosus* strain GG และยังมีอีกชนิดที่นิยมกันมากคือ แบคทีเรียกลุ่ม Bifidobacteria การใช้โปรไบโอติกจะให้ประโยชน์ต่อร่างกายในลักษณะของ functional food และต้องมีคุณสมบัติตามที่ต้องการ คือ สามารถคงสภาพสิ่งมีชีวิต มีกลิ่นและรสชาติหลังการหมักดี คงสภาพกรดอ่อน ๆ ตลอดระยะเวลาการเก็บซึ่งต้องมีการจัดเก็บอย่างดีและคงสภาพเดิมได้ (Bengmark, 2000) และมีคุณสมบัติเป็น functional food หรือ health food หมายถึงสารที่ร่างกายได้รับเข้าไป (ไม่จำเป็นต้องเป็นสารอาหารเสมอไป) แล้วช่วยกระตุ้นให้ร่างกายสามารถทำงานได้เต็มที่ ทำให้มีผลดีต่อสุขภาพในภาพรวม ทำให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายและจิตใจมากกว่าผลลัพธ์ของอาหารทั่ว ๆ ไป (Bellisle, Diplock, & Hornstra, 1998)

1.3 คุณสมบัติของโปรไบโอติก (วารี นิยมธรรม, 2549)

1.3.1 สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างคือ 20-60 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและสามารถมีชีวิตอยู่ในลำไส้ได้

1.3.2 สามารถสร้างกรดแลคติก ทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดมากขึ้นจึงเกิดการย่อยและการใช้ประโยชน์จากสารอาหารต่าง ๆ ได้ดีขึ้น และปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก

1.3.3 สร้างสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น folate ช่วยสร้างเม็ดเลือดแดง และวิตามินบี 2

1.3.4 สามารถสร้างเอนไซม์ pectinase, β-galactosidase, amylase, protease, lactase และ cellulose มีผลทำให้การย่อยและใช้ประโยชน์จากสารอาหารต่าง ๆ ได้ดีขึ้น

1.3.5 สามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อโรคที่เป็น primary metabolite เช่น กรดอินทรีย์ และ secondary metabolite เช่น bacteriocin

1.3.6 สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้ดี

1.3.7 สามารถทนต่อน้ำดีได้ดี เนื่องจากน้ำดีมีหน้าที่ขับสารตกค้างในร่างกาย แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* หลายชนิดซึ่งอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ มีคุณสมบัติทนต่อเกลือน้ำดีและมีความสำคัญต่อระบบสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้

1.4 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก

มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่นิยมนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก ดังนี้

1.4.1 *Lactobacillus* เป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่มีลักษณะแตกต่างกัน ใช้อนุกรมวิธานในการแยกได้มากกว่า 100 ชนิด จัดเป็นจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติก จุลินทรีย์ *Lactobacillus*

หลายชนิดจะมีลักษณะเฉพาะที่พบในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับระบบห่วงโซ่อาหาร (Food chain) ใช้ในกระบวนการหมักอาหารและอาหารสัตว์ สำหรับนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับมนุษย์และสัตว์

1.4.2 *Enterococcus* เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม Lactic acid bacteria พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและในผลิตภัณฑ์อาหาร เป็นเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ *E. faecium* และ *E. faecalis* เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้มากในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ จุลินทรีย์กลุ่มนี้ถูกนำมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น cheese และยังใช้เป็นสารเสริมในอาหารและอาหารสัตว์ (Gaggia et al., 2010) ผลการใช้ *E. faecium* SF68 ในสุกรเพื่อเพิ่มอัตราการเจริญพบว่า การให้ *E. faecium* SF68 สามารถช่วยเพิ่มการเจริญของสุกรได้ภายหลังจากการใช้เป็นเวลา 8 สัปดาห์ และสามารถช่วยลดการแอมโมเนีย ไฮโดรเจนซัลไฟด์ในมูลสุกรและลดไขมันในเนื้อสุกรได้ (Chen et al., 2006)

1.4.3 *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างสปอร์ พบได้ทั่วไปทั้งในดิน น้ำ อากาศ สายพันธุ์ *Bacillus* เป็นจุลินทรีย์ที่ใช้เติมลงไปในอาหาร เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียเข้าไปทำงานในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ การใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* จะอาศัยคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อเพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับเสริมในอาหารสัตว์ (Gaggia et al., 2010)

1.4.4 *Saccharomyces* จัดอยู่ในกลุ่มยีสต์ ที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ *S. cerevisiae* สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ พบในพืช ผลไม้และดิน อีกสายพันธุ์ที่รู้จักกันคือ *S. boulardii* ซึ่งแยกได้จากผิวของลิ้นจี่ที่ปลูกในอินโดจีน ส่วนมากใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์เคี้ยวเอื้องและใช้เป็นสารเสริมในอาหารสุกร (Gaggia et al., 2010) ยีสต์ที่มีชีวิตเมื่อใช้เป็นโปรไบโอติกจะช่วยปรับปรุงกระบวนการหมักในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยมีกลไกคือ สามารถใช้ออกซิเจนในกระเพาะรูเมนในการเผาผลาญน้ำตาลและ oligosaccharide สายสั้น ๆ จากอาหารและยังเป็นแหล่งวิตามิน แร่ธาตุ และกรดอะมิโนสำหรับจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนด้วย (สินีนาฏ พลโยราช และเมธา วรรณพัฒน์, 2558)

1.4.5 *Bifidobacterium* พบในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ Bifidobacteria เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความสำคัญ ใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงสภาวะสุขภาพของคนและสัตว์ เป็นประโยชน์ในการรักษาสมดุลในระบบทางเดินอาหาร ลดความเสี่ยงของการติดเชื้อก่อโรคหลายชนิด (Gaggia et al., 2010) การศึกษา *B. animalis* subsp. *lactis* ในการส่งเสริมการเจริญของลูกสุกรหลังหย่านม พบว่า *B. animalis* subsp. *lactis* สามารถเพิ่มจำนวนใน caecum ของสุกรได้ และจากผลการศึกษาพอสรุปเป็นแนวทางได้ว่าการใช้ *B. animalis* subsp. *lactis* ที่ความเข้มข้น

10^{11} cfu ต่อตัวต่อวัน เป็นทางเลือกที่ดีที่สุดในการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของลูกสุกรหลังหย่านมได้ (Modesto et al., 2009)

สำหรับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับการศึกษาหรือนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารสัตว์แสดงในตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารสัตว์ (Gaggia et al., 2010)

Genus	**Species**
แบคทีเรีย	
Bifidobacterium	*B. animalis* subsp. *animalis (B. animalis)* *B. lactis* subsp. *lactis (B. lactis)* *B. longum* subsp. *longum (B. longum)* *B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum (B. pseudolongum)* *B. thermophilum*
Enterococcus	*E. faecalis (Streptococcus faecalis)* *E. faecium (Streptococcus faecium)*
Lactobacillus	*L. acidophilus* *L. amylovorus* *L. brevis* *L. casei* subsp. *casei (L. casei)* *L. crispatus* *L. farmicinis* *L. fermentum ,* *L. murinus* *L. plantarum* subsp. *plantarum (L. plantarum)* , *L. reuteri* *L. rhamnosus*

ตารางที่ 2-1 (ต่อ)

Genus	Species
แบคทีเรีย	
Lactobacillus	*L. salivarius* *L. amylovorus (L. sobrius)*
Leuconostoc	*L. lactis* subsp. *cremoris (Streptococcus cremoris)* *L. lactis* subsp. *lactis* *L. citreum* *L. lactis* *L. mesenteroides*
Pediococcus	*P. acidilactici* *P. pentosaceus* subsp. *pentasaceous*
Propionibacterium	*P. freudenreichii*
Streptococcus	*S. infantarius* *S. salivarius* subsp. *Salivarius* *S. thermophilus (S. salivarius* subsp. *thermophilus)*
Bacillus	*B. cereus (B. cereus* var. *toyoi)* *B. licheniformis* *B. subtilis*
ยีสต์	
Saccharomyces	*S. cerevisiae (S. boulardii)* *S. pastorianus (S. carisbergensis)*
Kluyveromyces	*K. fragilis* *K. marxianus*
รา	
Aspergillus	*A. oryzae* *A. niger*

1.5 กลไกการทำงานของโปรไบโอติก

เชื้อแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารจะประกอบด้วยแบคทีเรีย 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ กลุ่มแบคทีเรียที่เป็นมิตรและกลุ่มแบคทีเรียก่อโรค โดยแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มนี้จะอยู่กันแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) เกิดเป็นภาวะสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ เรียกว่า eubiosis แบคทีเรียที่เป็นมิตรส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Lactobacillus* และ Bifidobacteria ซึ่งมีปริมาณมากถึง 85 เปอร์เซ็นต์ ของแบคทีเรียทั้งหมด เป็นเกราะป้องกันขั้นแรกต่อการรุกรานของแบคทีเรียก่อโรค แต่อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นที่ทำให้ความสมดุลในลำไส้สูญเสียไป เช่น อาหาร ภูมิอากาศ อายุ การใช้ยาปฏิชีวนะ การป่วย ความเครียด และพฤติกรรมการดำรงชีวิต เป็นต้น ดังนั้นจุดประสงค์ในการเติมโปรไบโอติกลงในอาหารสัตว์ จึงเป็นการเพิ่มหรือเสริมแบคทีเรียที่เป็นมิตรกลับคืนสู่ร่างกายของสัตว์ เพื่อเป็นการรักษาสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้และป้องกันการรุกรานของแบคทีเรียก่อโรค (นภาพร เลิศวรปรีชา, 2550)

แบคทีเรียโปรไบโอติกสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ด้วยกลไกสำคัญ 2 ประการ คือ การแย่งพื้นที่ในการยึดเกาะ (competition adhesion stie) กับ intestinal mucosa และการแย่งสารอาหารต่าง ๆ (competition nutrient) เนื่องจากการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกจะทำให้แบคทีเรียเจริญครอบคลุมผิวเยื่อผนังลำไส้ นอกจากนั้นแบคทีเรียโปรไบโอติกสามารถสร้างสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย ได้แก่ กรดอินทรีย์ (organic acid) แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (Franz, Holzapfel, & Stiles, 1999)

1.6 การคัดเลือกแบคทีเรียเป็นโปรไบโอติก

ในการคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกนั้นสิ่งที่ต้องทำการทดสอบเป็นอย่างแรก คือ การศึกษาการทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร และการทนต่อน้ำดีในลำไส้ เนื่องจากจะแสดงให้เห็นถึงความสามารถของแบคทีเรียที่จะอยู่รอดและผ่านกระเพาะอาหารของสัตว์ได้ ต่อมาคือศึกษาการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ ซึ่งจะแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสามารถที่จะ colonize ในลำไส้และไม่ถูกขับออกจากร่างกาย สามารถที่จะสร้างประโยชน์ให้กับร่างกายได้ และศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียอื่น ชนิดของสารยับยั้งที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ศึกษารูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพ เป็นต้น (Klaenhammer, 1993) การที่จะนำจุลินทรีย์ชนิดใดมาเป็นโปรไบโอติกจะต้องมีการศึกษาและทดสอบทางวิทยาศาสตร์เพื่อให้ทราบข้อมูลในเรื่องคุณสมบัติ ประสิทธิผลต่อสุขภาพและความปลอดภัย ได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกา (The United States Food and Drug Administration (FDA) (USFDA)) รับรองว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally Regarded As Safe หรือ GRAS)

ซึ่งได้มีการศึกษาและนำมาใช้ในสิ่งมีชีวิต มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์รับรองถึงความปลอดภัยในการนำมาใช้ โดยทั่วไปเกณฑ์ในการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่จะนำมาใช้กับคนและสัตว์มีดังนี้

1. สามารถอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ชนิดนั้น ๆ ได้
2. ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค
3. สามารถเจริญเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารได้
4. มีปริมาณสูงเพียงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ (สำนักการแพทย์ทางเลือก, 2556)

สำหรับประเทศไทย สายพันธุ์ของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ใช้เติมในอาหารสัตว์จะต้องเป็นรายชื่อของจุลินทรีย์ที่ระบุให้อยู่ในกลุ่ม “สารเสริมชีวนะ” ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ ปริมาณการใช้และเงื่อนไขในการห้ามผลิต นำเข้าหรือขายอาหารสัตว์ พ.ศ. 2559 ข้อ 9 กำหนดให้ชีวภัณฑ์ซึ่งมีชื่อทางวิชาการอาหารสัตว์ว่า “สารเสริมชีวนะ” ต่อไปนี้เป็นวัตถุที่เติมในอาหารสัตว์ โดยมีปริมาณที่ใช้ผสมในอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปแล้วจะต้องมีอัตราส่วนหรือปริมาณของสารเสริมชีวนะชนิดเดียวหรือหลายชนิดรวมกันไม่น้อยกว่า $1x10^5$ ซี.เอฟ.ยู. (CFU) ต่ออาหารสัตว์ 1 กิโลกรัม ดังแสดงในตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 รายชื่อของจุลินทรีย์ที่ระบุให้อยู่ในกลุ่ม “สารเสริมชีวนะ” ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2559

(ก) แบคทีเรีย	**(ข) รา**
(1) *Lactobacillus plantarum*	(1) *Pediocuceus* spp.
(2) *Lactobacillus casei*	(2) Yeast
(3) *Lactobacillus fermentum*	(3) *Aspergillus niger*
(4) *Lactobacillus brevis*	(4) *Aspergillus oryzae*
(5) *Lactobacillus bulgaricus*	(5) *Candida pintolepessi*
(6) *Lactobacillus acidophilus*	(6) *Saccharomyces cerevisiae*
(7) *Lactobacillus cellobiosus*	
(8) *Lactobacillus curvatus*	
(9) *Lactobacillus delbruekii*	
(10) *Lactobacillus lactis*	
(11) *Lactobacillus reuterii*	

ตารางที่ 2-2 (ต่อ)

(ก) แบคทีเรีย	(ข) รา
(12) *Lactobacillus helveticus*	
(13) *Leuconostoc mesenteroides*	
(14) *Streptococcus faecium cernelle 68* (15) *Streptococcus thermophilus* (16) *Streptococcus faecium* (17) *Streptococcus cremoris* (18) *Streptococcus diacetylactis* (19) *Streptococcus lactis* (20) *Streptococcus intermedius*	
(21) *Bacillus subtilis* strain BN (22) *Bacillus coagulan* (23) *Bacillus lentus* (24) *Bacillus lichenifermis* (25) *Bacillus pumilus* (26) *Bacillus subtilis* (27) *Bacillus toyoi*	
(28) *Bacteroides amylophilus* (29) *Bacteroides capillosus* (30) *Bacteroides ruminocola* (31) *Bacteroides suis*	
(32) *Bifidobacterium adolescentis* (33) *Bifidobacterium animalis* (34) *Bifidobacterium bifidum* (35) *Bifidobacterium infantis* (36) *Bifidobacterium longum* (37) *Bifidobacterium thermophilum*	

ตารางที่ 2-2 (ต่อ)

(ก) แบคทีเรีย	(ข) รา
(38) *Pediococcus acidilacticii* (39) *Pediococcus cerevisiae domosus* (40) *Pediococcus pentosaceus*	
(41) *Propionibacterium freudenreichii* (42) *Propionibacterium shermanii*	

ในการคัดเลือกจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ ๆ เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกนั้นต้องมีการทดสอบคุณสมบัติ ดังนี้

1. การศึกษาการทนกรดและการทนน้ำดี

การศึกษาความสามติก ซึ่งค่า pH ของารถในการทนกรดเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติก น้ำย่อยในกระเพาะอาหารอาจจะแตกต่างกันตั้งแต่ 2.0-3.5 ขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการกินอาหาร ระยะการเจริญหรือชนิดของสัตว์ เช่น ค่า pH ในกระเพาะแท้ของไก่มีค่าตั้งแต่ 2.5-4.74 และการย่อยอาหารจะใช้เวลา 1-3 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของอาหาร (Musikasang, Tani, & Maneerat, 2009) เช่นเดียวกับกระเพาะอาหารของมนุษย์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่แตกต่างกัน ค่าความเป็นกรดในกระเพาะอาหารมีค่า pH เท่ากับ 3 หรือต่ำกว่า และในลำไส้เล็กมีความเป็นด่างในระดับ pH ประมาณ 8-9 (สำนักการแพทย์ทางเลือก, 2556)

การศึกษาคุณสมบัติในการทนน้ำดีเป็นหลักการทั่วไปในการคัดเลือกโปรไบโอติก ซึ่งจะแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสามารถที่จะทนอยู่ในลำไส้ได้และน้ำดียังมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและกลุ่ม *Enterococcus* โดยจะช่วยย่อยสารอาหารประเภทไขมันในลำไส้ของคนและสัตว์ น้ำดีที่ถูกหลั่งเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนต้นจะมีความเข้มข้นสูงอยู่ในช่วง 1.5-2.0 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงแรกของการย่อยอาหาร หลังจากนั้นความเข้มข้นจะลดลงจนถึงประมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในลำไส้เล็กของไก่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีประมาณ 10-11 มิลลิโมลต่อกรัมของอาหารที่กิน สัตว์ต่างชนิดกันจะมีองค์ประกอบของน้ำดีแตกต่างกัน (Noriega, Gueimonde, Sanchez, Margolles, & Reyes-Gavilan, 2004)

2. การศึกษาการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้

ความสามารถในการยึดติดกับเยื่อเมือกผนังลำไส้เป็นคุณสมบัติที่มีความสำคัญในการส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค เพราะเป็นการเริ่มต้นของการอาศัยในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตและช่วยปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกันของผู้บริโภคได้ เมื่อจุลินทรีย์โปรไบโอติกซึ่งเป็นจุลินทรีย์ชนิดดีและมีประโยชน์เข้าไปในระบบทางเดินอาหารและยึดเกาะกับผนังลำไส้ ระบบภูมิคุ้มกันจะจดจำและยอมให้อยู่ร่วมกัน โดยจุลินทรีย์จะอาศัยอาหารในการเจริญและผลพลอยได้คือผู้บริโภคจะได้รับสิ่งที่เป็นประโยชน์ร่วมกัน เป็นการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน (สำนักการแพทย์ทางเลือก, 2556) ส่วนในระบบทางเดินอาหารของสัตว์โดยเฉพาะบริเวณลำไส้จะมีการย่อย ทำลายและขับของเสียออกมา การศึกษาการยึดเกาะของแบคทีเรียกับเยื่อเมือกผนังลำไส้จะแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการยึดเกาะและ colonization ในลำไส้ กลไกการยึดเกาะของแบคทีเรียกับเยื่อเมือกผนังลำไส้แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ การยึดเกาะแบบไม่จำเพาะ (non-specific) ได้แก่ แบบใช้แรงวาลเดอวาลส์ (van-der-waal's force) แบบใช้ประจุ (charge) แบบปฏิกิริยาชอบน้ำ (hydropholic interaction) และการยึดเกาะด้วยปฏิกิริยาไอออน (cation interaction) ส่วนการยึดเกาะแบบจำเพาะ (specific) เป็นการยึดติดที่มีความจำเพาะกันของ receptor กับ ligand ซึ่งมักจะพบในแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Salmonella* Thyphimurium (Althouse, Patterson, Fedorka-Cray, & Isaacson, 2003)

3. การศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพ

ในการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกในบางครั้งอาจจะมีการใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะ จึงจำเป็นต้องศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรียที่จะนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการดื้อยาต้านจุลชีพของแบคทีเรีย เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจเลือกแบคทีเรียนั้นมาใช้เป็นโปรไบโอติก (ปิยมาศ ศรีภูมิ และคณะ, 2548) อย่างไรก็ตามยังมีข้อถกเถียงกันอยู่มากว่าในการเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติกนั้นควรเลือกแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหรือเลือกแบคทีเรียที่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะดี ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของการนำเอาโปรไบโอติกนั้นไปใช้ประโยชน์ (นภาพร เลิศวรปรีชา, 2550) ปัจจุบันพบว่ามีแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาแวนโคมัยซิน เช่น แบคทีเรียกลุ่ม Enterococci เป็นสาเหตุของการติดเชื้อ Vancomycin Resistance Enterococci (VRE) และแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถถ่ายทอดยีนดื้อยาให้กับแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกันหรือแบคทีเรียใกล้เคียงได้โดยพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม Enterococci ดื้อต่อยาแวนโคมัยซินที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 64 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ปิยมาศ ศรีภูมิและคณะ, 2548)

การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ *Bifidobacterium* spp. มีเหตุผลที่น่าสนใจอยู่ 2 ข้อ ข้อที่หนึ่งคือความเป็นไปได้ในการใช้ *Bifidobacterium* spp. ในทางเดินอาหารเพื่อไม่ให้ถูกทำลายจากการได้รับยาปฏิชีวนะ ข้อที่สองคือความเป็นไปได้ในการอยู่ร่วมกันของยาปฏิชีวนะที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ *Bifidobacterium* spp. ทั้งจากพืช สิ่งส่งตรวจทางการแพทย์หรือจากตัวอย่างอาหาร การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Bifidobacterium* spp. มีงานวิจัยที่ทำการศึกษาน้อยมากและงานวิจัยส่วนใหญ่ไม่ค่อยได้รับการตีพิมพ์ในระดับสากล เนื่องจากความยุ่งยากเพราะเงื่อนไขและข้อจำกัดหลายอย่าง อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ *Bifidobacterium* spp. พบว่าสามารถต้านทานยาปฏิชีวนะ nalidixic acid, gentamicin, kanamycin, metronidazole, neomycin,polymyxin B และ streptomycin ได้ แต่จะถูกยับยั้งด้วย ampicillin, bacitracin,chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, lincomycin, nitrofurantoin, oleandomycin, penicillin G, vancomycin และมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ tetracycline (Ballongue, 2004)

1.7 ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกในอาหารสัตว์

ประโยชน์และผลลัพธ์ของการใช้โปรไบโอติกในอาหารสัตว์ สามารถสรุปได้ดังนี้ (เยาวมาลย์ ค้าเจริญ และสาโรจน์ ค้าเจริญ, 2535)

1.7.1 ใช้เป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์เลี้ยงในฟาร์ม

1.7.2 ใช้ควบคุมจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค โดยเฉพาะในระบบทางเดินอาหารและในขณะเดียวกันยังช่วยกระตุ้นให้สัตว์สร้างภูมิคุ้มกันโรคได้

1.7.3 ช่วยทำให้การใช้น้ำตาลแลคโตสในนมเกิดขึ้นได้ดีขึ้น โดยไปเพิ่มเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (B-galactosidase) ให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น ทำให้สัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเฉพาะสัตว์อ่อน สามารถนำน้ำตาลจากนมไปใช้ประโยชน์ได้ดีและเพิ่มขึ้น

1.7.4 ลดการเกิดการท้องผูก

1.7.5 มีกิจกรรมในการลดหรือยับยั้งเนื้องอก (antitumor activities) โดยไปยับยั้งการสร้างเซลล์เนื้องอกหรือไปควบคุมการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการหลั่งสารก่อมะเร็ง (carcinogens) หรือไปทำลายสารก่อมะเร็ง เช่น สารไนโตรซามีน (nitrosamines) หรือไปลดการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างสารไนโตรซามีน

1.7.6 มีผลการยับยั้งการสร้างคอเลสเทอรอล (cholesterol) ในร่างกายได้ โดยทำให้คอเลสเทอรอลในกระแสเลือดลดลง แบคทีเรียโปรไบโอติกจะสามารถลดระดับของคอเลสเทอรอลได้โดยแบคทีเรียโปรไบโอติกสร้าง bile salt hydrolase (BSH) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายคอเลสเทอรอลเกิดเป็นคอเลสเทอรอลอิสระที่สามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้

1.8 คุณสมบัติของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ใช้ในอุตสาหกรรม

กระบวนการผลิตในอุตสหกรรมอาหารหรืออาหารสัตว์ เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อและมีอัตราการรอดชีวิตในปริมาณที่เพียงพอหลังจากผ่านกระบวนการผลิต จุลินทรีย์ต้องผ่านสภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการผลิต เช่น ผ่านความร้อนในการทำ spray drying หรือผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) รวมถึงต้องมีการสัมผัสกับออกซิเจนในระหว่างกระบวนการผลิต ซึ่งการสัมผัสกับออกซิเจนหรือสัมผัสอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำเกินไปนั้นอาจส่งผลกระทบต่อโครงสร้างที่เป็นองค์ประกอบภายในของจุลินทรีย์ (Simpson et al., 2005) จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาคุณสมบัตินี้เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาต่อไป

2. *Bifidobacterium* spp.

Bifidobacterium spp. ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1899 โดยถูกคัดแยกได้จากอุจจาระเด็กที่ดื่มนมแม่ โดย Tissier และเรียกชื่อว่า *Bacillus bifidus* ในปี ค.ศ. 1924 Orla-Jensen ได้จัดจำแนกและระบุว่า Bifidobacteria มีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียในจีนัส *Lactobacillus* ต่อมาใน 8th edition Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ได้จัดจำแนก Bifidobacteria ให้อยู่ใน genus *Bifidobacterium* , family Actinomyceteceae , order Actinomycetales โดยใช้โครงสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียในการแยกความแตกต่าง แต่อย่างไรก็ตาม Bifidobacteria ยังคงมีลักษณะคล้ายคลึงกับ family Lactobacillaceae มากกว่า family Actinomyceteceae ใน 9th edition Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ได้ระบุว่าจีนัส Bifidobacterium เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์ (Parte, 2012)

แบคทีเรียจีนัส *Bifidobacterium* แตกต่างจากแบคทีเรียในจีนัส *Lactobacillus* คือจีนัส *Bifidobacterium* สามารถใช้น้ำตาล fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) ได้ในขณะที่จีนัส *Lactobacillus* ไม่สามารถใช้น้ำตาลนี้ได้จึงใช้คุณสมบัตินี้ในการจำแนกจีนัส *Bifidobacterium* ออกจากจีนัส Lactobacillus ได้ และในการศึกษาเปอร์เซ็นต์ของ guanine + cytosine (เปอร์เซ็นต์ G+C) ใน DNA ของจีนัส *Bifidobacterium* พบว่ามีสูงถึง 55-67 เปอร์เซ็นต์ โมลของปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด ซึ่งจะแตกต่างจากของจีนัส *Lactobacillus*, *Corynebacterium* และ *Propionibacterium* จึงสามารถแยกจีนัส *Bifidobacterium* ออกจากจีนัสอื่นได้ (Ballongue, 2004. p.68)

Bifidobacterium spp. เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญกับสุขภาพของมนุษย์ ส่วนใหญ่ใช้เป็นโปรไบโอติกสำหรับมนุษย์ โดย *Bifidobacterim* spp. เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่อยู่ใน

ระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (Russell, Ross, Fitzgerald, & Stanton, 2011) *Bifidobacterium* spp. ถูกจัดจำแนกตามอนุกรมวิธาน (Parte, 2012) ดังนี้

Phylum : Actinobacteria

Class : Actinobacteria

Subclass : Actinobacteridae

Order : Bifidobacteriales

Family : Bifidobacteriaceae

Genus : Bifidobacterium

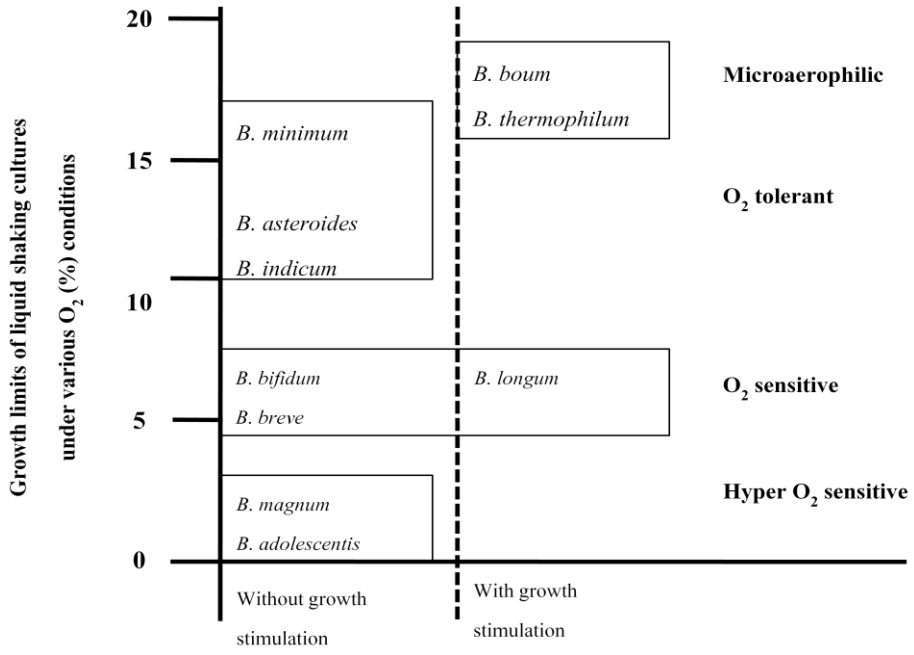
2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Bifidobacterium spp. จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน การย้อมติดสีแกรมไม่สม่ำเสมอ รูปร่างแตกต่างกัน บางเซลล์โค้ง บางเซลล์เป็นกระบอง (clubbed) การเรียงตัวมักเรียงตัวเป็นสาย บางครั้งอาจเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือบางครั้งเรียงตัวเป็นรูปตัววี สำหรับการเรียงตัวเป็นสายมักเป็นการเรียงตัวที่ซับซ้อนของเซลล์ที่เท่ากันในแนวเดียวกันคล้ายรั้ว (palisades of parallel cells) หรือเรียงตัวเป็นรูปแฉกคล้ายดอกกุหลาบ (rosette) บางครั้งเซลล์บวมอาจมองเห็นเป็นรูปกลมได้ *Bifidobacterium* spp. จัดเป็น anaerobes บางชนิดสามารถเจริญได้ในบรรยากาศที่มี CO_2 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่สร้างสปอร์ ไม่ผลิตเอนไซม์ catalase ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างแคปซูล หมักย่อยน้ำตาลกลูโคส อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ คือ 37-41 องศาเซลเซียส ไม่มีสมบัติเป็น acid-fast ไม่รีดิวซ์ไนเตรต แต่ถ้าหากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีเม็ดเลือดแดงผสมอยู่อาจรีดิวซ์ไนเตรตได้ ส่วนใหญ่ผลิตเอนไซม์ urease ปกติไม่มีสมบัติในการก่อโรค (nonpathogenic) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ Lactobacillaceae (นันทนา อรุณฤกษ์, 2549) pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ คือ 6.5-7.0 แต่จะไม่เจริญที่ pH 4.5-5.0 หรือ 8.0-8.5 ซึ่งแตกต่างจาก *Lactobacillus* คือ *Lactobacillus* จะมีรูปร่างท่อนสั้นหรือท่อนยาว pH ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ คือ 5.5-6.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ คือ 30-40 องศาเซลเซียส สร้างกรดแลกติคจากกระบวนการหมัก ในขณะที่ *Bifidobacterium* spp. จะมีรูปร่างไม่แน่นอน สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ และสร้างกรดแลคติกและกรดอะซิติกจากกระบวนการหมัก (Garrity, 1986, pp.1208-1211)

2.2 การเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน

Bifidobacterium spp. บางสปีชีส์สามารถทนออกซิเจนได้ เช่น *B. psychraerophilum*, *B. scardovii* และ *B. tsurumiense* สามารถเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนได้ การเจริญของ *Bifidobacterium* spp. ภายใต้ความเข้มข้นของออกซิเจนที่แตกต่างกันสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระดับ คือ O_2-hypersensitive, O_2-sensitive, O_2-tolerant และ microaerophilic จากการศึกษา

ของ Kawasaki, Mimura, Satoh, Takesa, and Niimura (2006) ได้ศึกษาความสามารถในการทนออกซิเจนของ *Bifidobacterium* spp. ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนที่แตกต่างกัน (0, 5, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์) ในอาหารเหลวและมีการปั่นกวนที่ 130 rpm ให้ผลการทดสอบดังภาพที่ 2-1



ภาพที่ 2-1 การเจริญของ *Bifidobacterium* spp. ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนที่แตกต่างกันในอาหารเหลว (Kawasaki et al., 2006)

2.3 สารอาหารและปัจจัยการเจริญของ *Bifidobacterium* spp.

Bifidobacterium spp. ส่วนใหญ่ใช้ ammonium salts เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ การเลี้ยง *Bifidobacterium* spp. ในหลอดทดลองที่เติมสารอินทรีย์ต่าง ๆ ที่เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า *Bifidobacterium* spp. สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนได้หลายชนิด เช่น *B. bifidus* สามารถผลิต alanine valine และ aspartic acid ได้ถึง 150 mg/L ของ threonine

Bifidobacterium spp. ต้องการวิตามินในการเจริญ โดยเฉพาะวิตามิน B1 (thiamine) B6 (pyridoxine), B9 (folic acid), B12 (cyanocobalamine) และ PP (nicotinic acid) โดยการสังเคราะห์วิตามินนั้นขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ (Ballongue, 2004) การสังเคราะห์วิตามินของจุลินทรีย์กลุ่ม *Bifidobacterium* spp. แสดงดังตารางที่ 2-3

ตารางที่ 2-3 การสังเคราะห์วิตามินของ *Bifidobacterium* spp. (Ballongue, 2004)

	B. breve	***B. infantis***	***B. longum***	***B. bifidum***	***B. adolescentis***
Thiamine (B_1)	+	+++	+	+++	+
Riboflavin (B_2)	+	+	+++	++	+
Pyridoxine (B_6)	++	++	+++	+	++
Folic acid (B_9)	+	+++	+	++	+
Cobalamine (B_{12})	+	++	+++	+	+
Ascorbic acid (C)	++	++	+++	++	+
Nicotinic acid (PP)	+++	+++	+	+++	+
Biotin (H)	++	+++	++	++	++

Bifidobacterium spp. สามารถเจริญได้ในอาหาร semi-synthetic medium ที่ประกอบด้วย lactose กรดอะมิโนอิสระ 3 ชนิด คือ cysteine glycine และ tryptophan วิตามิน nucleotides และแร่ธาตุบางชนิด L-cysteine ในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อทำหน้าที่เป็นแหล่งไนโตรเจนให้กับเชื้อ *Bifidobacterium* spp. และทำหน้าที่ในการลดรีดอกซ์โพเทนเชียลในอาหารจึงช่วยส่งเสริมให้เกิดสภาวะไร้อากาศซึ่งเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีส่วนผสมของ HCl เพื่อช่วยในการฟื้นฟูเซลล์ของเชื้อ *Bifidobacterium* spp. การแยกความแตกต่างระหว่าง lactobacilli และ *Bifidobacterium* spp. บางสายพันธุ์สามารถจำแนกได้โดยใช้อาหารที่ประกอบไปด้วยไนโตรเจนและ ammonium โดย *Bifidobacterium* spp. สามารถใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ สารอาหารที่เชื้อ *Bifidobacterium* spp. ต้องการในการเจริญเรียกว่า prebiotic ซึ่งเป็นสารประกอบพวกคาร์โบไฮเดรตไม่ถูกเผาผลาญด้วยกระบวนการ metabolism ของเจ้าบ้านและเคลื่อนที่ต่อไปยังลำไส้ใหญ่หรือ caecum ซึ่งจะมี *Bifidobacterium* spp. ทำหน้าที่เผาผลาญ prebiotic ไปเป็นพลังงาน (Gomes & Malcata, 1999) ดังนั้น prebiotic จึงหมายถึงส่วนประกอบของอาหารที่ไม่ถูกย่อยในทางเดินอาหาร เช่น oligofructose, fructo oligosaccharides, inulin, polyfructose, chicory root extract เป็นต้น ช่วยกระตุ้นการเจริญและกิจกรรมของแบคทีเรียกลุ่มโปรไบโอติกในลำไส้ใหญ่ (Gaggia et al., 2010)

2.4 *Bifidobacterium* spp. ในระบบทางเดินอาหาร

สายพันธุ์ของ *Bifidobacterium* spp. จะอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ เริ่มต้นจากปาก กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก (ประกอบด้วย duodenum, jejunum และ

ileum) และลำไส้ใหญ่ (ประกอบด้วย caecum, colon และ rectum) แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ สามารถพบได้ในส่วนที่แตกต่างกันของระบบทางเดินอาหาร แต่ *Bifidobacterium* spp. สามารถพบได้ตลอดระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ (Russell et al., 2011)

Bifidobacterium spp. บางสายพันธุ์พบครั้งแรกในลำไส้ของมนุษย์ ประกอบไปด้วย *B. longum, B. breve, B. bifidum, B. adolesccntis* และ *B. pseudocatenulatum* ส่วนสายพันธุ์ที่พบในสัตว์ เช่น *B. pseudolongum, B. thermophilus* และ *B. animalis* ในสัตว์บางชนิดพบสายพันธุ์ที่มีความเฉพาะเจาะจง เช่น *B. magnum* และ *B. cuniculi* พบในมูลกระต่ายเพียงอย่างเดียว *B. pullorum* และ *B. galinarum* พบในลำไส้ไก่ และ *B. suis* พบเฉพาะในมูลสุกรเท่านั้น *B. minimum* และ *B. subtile* พบในสิ่งปฏิกูลเท่านั้น (Matteuzzi et al., 1971) นอกจากนี้ *Bifidobacterium* spp. สามารถพบได้ในนิเวศวิทยาที่แตกต่างกัน คือ ลำไส้มนุษย์ ช่องคลอดของมนุษย์ ช่องปาก อาหาร ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ สิ่งปฏิกูลและลำไส้ของผึ้ง สภาพแวดล้อมที่สามารถพบเชื้อ *Bifidobacterium* spp. แสดงดังตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-4 แหล่งที่อยู่อาศัยของ Genus *Bifidobacterium* ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์ (Russell et al., 2011)

สปีชีส์	**แหล่งที่พบครั้งแรก**	**อ้างอิง**
B. adolescntis	อุจจาระมนุษย์ผู้ใหญ่, กระเพาะวัว, สิ่งปฏิกูลและช่องคลอดมนุษย์	Reuter (1963)
B. angulatum	สิ่งปฏิกูล, อุจจาระผู้ใหญ่	Scardovi and Crociani (1974)
B. animalis Subsp. *animalis* Subsp. *lactis*	 มูลสัตว์ โยเกิร์ต	 Scardovi and Trovatelli (1974) Meile et al. (1997)
B. bifidum	อุจจาระผู้ใหญ่, อุจจาระเด็กทารก, ลูกวัวและช่องคลอดมนุษย์	Orla-Jensen (1924)
B. boum	กระเพาะวัว, มูลลูกสุกร	Scardovi et al. (1979)
B. breve	อุจจาระเด็กทารก	Reuter (1963)
B. catenulatum	อุจจาระเด็กทารก , อุจจาระผู้ใหญ่และสิ่งปฏิกูล	Scardovi and Crociani (1974)
B. choerinum	มูลลูกสุกรและสิ่งปฏิกูล	Scardovi et al. (1979)

ตารางที่ 2-4 (ต่อ) (Russell et al., 2011)

สปีชีส์	แหล่งที่พบครั้งแรก	อ้างอิง
B. dentium	ช่องปากมนุษย์ที่ฟันผุ, อุจจาระมนุษย์ผู้ใหญ่, ฝี	Scardovi and Crociani (1974)
B. gallicum	อุจจาระมนุษย์	Lauer (1990)
B. gallinarum	ลำไส้ใหญ่ส่วนต้นของไก่	Watabe et al. (1983)
B. infantis	อุจจาระเด็กทารก	Reuter (1963)
B. longum		
subsp. *longum*	อุจจาระผู้ใหญ่	Reuter (1963)
subsp. *infantis*	อุจจาระผู้ใหญ่	Reuter (1963)
subsp. *suis*	มูลลูกสุกร	Matteuzzi et al. (1971)
B. pseudolongum		
subsp. *pseudolongum*	อุจจาระเด็กทารก	Mitsuoka (1969)
subsp. *globosum*	มูลสุกร, ไก่, วัว, ลูกวัว, หนู	Biavati et al. (1982)
B. pullorum	มูลสุกร	Trovatelli et al. (1974)
B. ruminantium	มูลไก่	Biavati and Mattarelli (1991)
B. subtile	อุจจาระมนุษย์	Biavati et al. (1982)
B. thermophilum		
Subsp. *porcinum*	มูลลูกสุกร	Mitsuoka (1969)

2.4.1 *Bifidobacterium* spp. ในระบบทางเดินอาหารเด็กทารก (สำนักการแพทย์ทางเลือก, 2556)

เมื่อทารกอยู่ในครรภ์มารดาจะยังไม่มีจุลินทรีย์ในลำไส้ แต่จะได้รับจุลินทรีย์ครั้งแรกเมื่อคลอดผ่านทางช่องคลอดของมารดา หลังจากนั้นก็จะได้รับจุลินทรีย์จากกิจกรรมต่าง ๆ เช่น การรับประทานอาหาร การดื่มนมจากมารดา การหายใจ การสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่จุลินทรีย์นั้นอยู่ ในแต่ละช่วงอายุของเด็กจะพบชนิดของจุลินทรีย์ต่าง ๆ โดยได้มีการศึกษากลุ่มแบคทีเรียในอุจจาระเด็กแบ่งได้เป็น 4 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 ช่วงแรกหลังคลอดและช่วง 1-2 สัปดาห์แรก พบว่าในวันที่ 1-3 จะพบจุลินทรีย์คือ *E. coli* และ *Streptococci* วันที่ 4-7 พบจุลินทรีย์ *Bifidobacterium* spp., *Clostridium, Bacteroides*

ระยะที่ 2 ช่วงให้นมบุตรจากมารดาอย่างเดียว พบจุลินทรีย์เด่น ๆ คือ *Bifidobacterium* spp.

ระยะที่ 3 ช่วงเริ่มให้อาหาร การเริ่มให้อาหารเป็นสาเหตุใหญ่ที่ทำให้จุลินทรีย์ที่พบในอุจจาระเปลี่ยนแปลงไป จุลินทรีย์ที่พบคือ *Clostridium , E. coli* และ *Streptococci* และอาจจะพบจุลินทรีย์ *Bacteroides, Peptococcus, Peptostreptococcus*

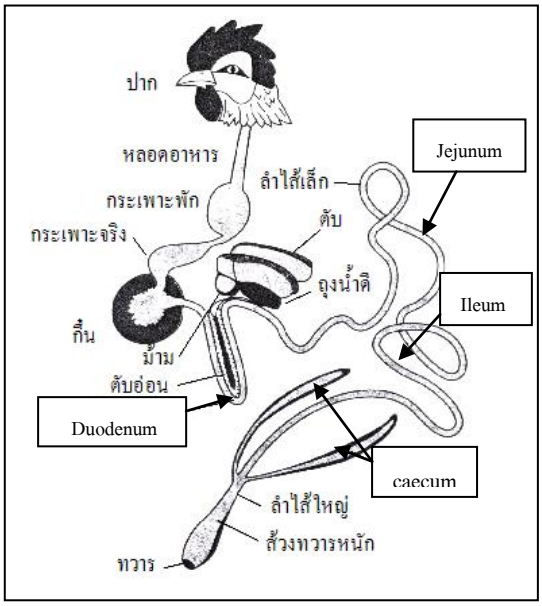
ระยะที่ 4 ช่วงหลังหย่านม ซึ่งจะพบจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารเหมือนผู้ใหญ่ โดยมีการเพิ่มหรือลดปริมาณของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ คล้ายกับผู้ใหญ่ กลุ่มจุลินทรีย์ที่พบได้แก่ *Bacteroides, Anaerobis cocci, Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* ส่วน *E. coli* จะมีจำนวนลดลง

จากการศึกษาและรวบรวมแหล่งที่พบเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ในมนุษย์ พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อสายพันธุ์ *B. bifidum, B. breve, B.catenulatum, B. infatis, B. longum* subsp. *infantis, B. pseudolongum* subsp. *pseudolongum* ในอุจจาระทารก และพบ *B. adolescentis, B. angulatum, B. bifidum, B. breve, B. catenulatum, B. gallicum, B. dentium, B. longum* subsp. *longum, B. subtile* ในอุจจาระผู้ใหญ่ (Russell et al., 2011)

2.4.2 *Bifidobacterium* spp. ในระบบทางเดินอาหารไก่

จากการศึกษานิเวศวิทยาของเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ส่วนมากจะพบในบริเวณที่แตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด โดยจะพบในส่วนของลำไส้ (วัว กระต่าย หนู ไก่และแมลง) และพบในมูลของสัตว์ (นก กระต่ายและหนู) จากการศึกษาในระดับสปีชีส์ที่คัดเลือกมาจากทางเดินอาหารของสัตว์ พบเชื้อ *B. cuniculi* ในกระต่าย *B. angulatum* ในวัว และ *B. gallinarum* ในไก่ (Turroni et al., 2011) การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะต่อการเจริญของ *Bifidobacterium* spp. เพื่อใช้คัดแยกเชื้อและนับจำนวนจุลินทรีย์ *Bifidobacterium* spp. ในลำไส้ส่วน caecum ของไก่ โดยการใช้อาหาร modified oligosaccharide antibiotic-selective agar medium พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อจากสำไส้ส่วน caecum ของไก่ได้ (Thitaram, Siragusa, & Hinton Jr, 2005)

จากการศึกษาและรวบรวมแหล่งที่พบเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ในไก่ พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อสายพันธุ์ *B. gallinarum* ในลำไส้ส่วน caecum ของไก่ และ *B. ruminantium* ในมูลไก่ (Russell et al., 2011) ซึ่งระบบทางเดินอาหารของไก่ แสดงดังภาพที่ 2-2



ภาพที่ 2-2 ทางเดินอาหารของไก่ (ไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum) ลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) และลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (caecum)) (บุญเสริม ชีวะอิสระกุล และบุญล้อม ชีวะอิสระกุล, 2542, หน้า 67 เข้าถึงได้จาก : http://elearning.nsru.ac.th/web_elearning/animals/lesson7_3.php)

ในระบบทางเดินอาหารของไก่ มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกันในแต่ละส่วนตั้งแต่ pH 2.5-8.4 ดังแสดงในตารางที่ 2-5 ดังนั้นการศึกษาคุณสมบัติการทนกรดของจุลินทรีย์จะแสดงให้เห็นถึงความสามารถของจุลินทรีย์ในการอยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งคือ ระยะเวลาที่อาหารผ่านเข้าสู่ทางเดินอาหารของไก่จะใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง (Sturkie, 1976)

2.4.3 *Bifidobacterium* spp. ในระบบทางเดินอาหารของสุกร

การศึกษาแยกเชื้อจุลินทรีย์ *Bifidobacterium* spp. จากสุกรโดยคัดแยกจากมูลแม่สุกรและมูลลูกสุกร พบว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ของ *Bifidobacterium* spp. ที่แยกได้ คือ *B. boum, B. thermophilum* และ *B. choerinum* โดย *B. thermophilum* ซึ่งแยกได้จากมูลแม่สุกร ส่วนสายพันธุ์อื่น ๆ แยกได้จากมูลลูกสุกร (Maxwell et al., 2004)

จากการศึกษาและรวบรวมแหล่งที่พบเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ในสุกร พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อสายพันธุ์ *B. choerinum, B. longum* subsp. *suis, B. thermophilum* subsp. *porcinum* และ *B. boum* ในมูลของลูกสุกร พบ *B. pullorum* ในมูลแม่สุกร (Russell et al., 2011)

ตารางที่ 2-5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในระบบทางเดินอาหารของไก่ (Sturkie, 1976)

ระบบทางเดินอาหาร	pH
กระเพาะพัก (Crop)	4.51
กระเพาะแท้ (Preventiculus)	4.80
กระเพาะบด (Gizzard)	2.50-4.74
ลำไส้เล็กส่วนต้น (Duodenum)	5.70-6.00
ลำไส้เล็กส่วนกลาง (Jejunum)	5.80-5.90
ลำไส้เล็กส่วนปลาย (Ileum)	6.30-6.40
ไส้ตรง (Rectum)	6.30
ไส้ตัน (Ceca)	5.50-5.70
ทวารรวม (Cloaca)	5.40-8.40

2.5 *Bifidobacterium* spp. ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกในอาหารสัตว์

จากที่กล่าวมาแล้วว่า *Bifidobacterium* spp. หลายสายพันธุ์สามารถนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในอาหารสัตว์ซึ่งประกอบไปด้วย *B. animalis, B. lactis, B. longum, B. bifidum, B. pseudolongum* และ *B. thermophilum* โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะต้องมีการศึกษาถึงคุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

2.5.1 ความปลอดภัยของสายพันธุ์ *Bifidobacterium* spp. ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก

การศึกษาความปลอดภัยของ *Bifidobacterium* spp. มีการศึกษาอย่างยาวนานทั้งในอาหารหมักและผลิตภัณฑ์นม รวมถึงการศึกษาความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ จากการศึกษา *Bifidobacterium* spp. 3 สายพันธุ์คือ *B. longum* BB536, *B. breve* M-16V และ *B. infantis* M-63 ไม่สามารถยึดเกาะเยื่อเมือกได้ และ *B. longum* BB 536 ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ในเซลล์เจ้าบ้านได้ การใช้ *Bifidobacterium* spp. เป็นโปรไบโอติกในอาหารแต่ละชนิดที่ต่างกันและต่อเนื่องพบว่ามีความปลอดภัย (Jia, Shigwedha, & Mwandemele, 2010)

2.5.2 การมีชีวิตรอดของ *Bifidobacterium* spp. ในระบบทางเดินอาหาร

ความสามารถในการมีชีวิตรอดในระบบทางเดินอาหารเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของโปรไบโอติก เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์มีความเป็นกรดสูงและเกลือน้ำดีจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย จากการศึกษาพบว่า *B. bifidium*, *B. longum* และ *B. infantis* สามารถรอดชีวิตได้ในกระเพาะอาหารที่มีความเป็นกรด pH 3 หลังจากผ่านไป 5 ชั่วโมง ซึ่งแสดง

ให้เห็นว่าสายพันธุ์เหล่านี้สามารถทนสภาพความเป็นกรดได้ และยังสามารถอยู่รอดในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 0.45 เปอร์เซ็นต์ ได้อีกด้วย (Jia et al., 2010)

2.5.3 ความคงทนของ *Bifidobacterium* spp. ในอาหารเสริมโปรไบโอติก

ความสำคัญอีกประการหนึ่งคือ ความสามารถในการอยู่รอดในวัสดุที่เป็นสื่อเพื่อให้มั่นใจว่าแบคทีเรียยังมีชีวิต สามารถทำงานได้และมีกิจกรรมการเผาผลาญสารอาหารเพื่อเป็นประโยชน์ต่อเจ้าบ้านเมื่อบริโภคได้ เช่น *B. anamalis* และ *B. lactis* สามารถอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส และสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่มีออกซิเจนสูงและมีความเป็นกรดได้ (Russell et al., 2011)

2.5.4 การป้องกันการติดเชื้อของสายพันธุ์ *Bifidobacterium* spp.

คุณสมบัติที่สำคัญของ *Bifidobacterium* spp. ในการเป็นโปรไบโอติก คือ ความสามารถในการที่จะช่วยป้องกันการติดเชื้อจากแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค เช่น เชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* spp. จุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้หากอยู่ในระบบทางเดินอาหารจะก่อให้เกิดอันตรายต่อเจ้าบ้าน กลไกการทำงานของ *Bifidobacterium* spp. มีหลายกลไก เช่น การผลิต SCFA, hydrogen peroxide หรือ bacteriocins การแข่งขันเพื่อยึดติดกับลำไส้ การสร้างสารพิษกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งจากการศึกษาเหล่านี้พบว่า *Bifidobacterium* spp. มีบทบาทและศักยภาพในการป้องกันการติดเชื้อได้ดี (Russell et al., 2011)

3. การประยุกต์ใช้โปรไบโอติกในอาหารสัตว์

3.1 สุกร ปัจจุบันฟาร์มสุกรส่วนใหญ่เน้นการจัดการด้านสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจทำให้เกิดความไม่สมดุลของระบบนิเวศในลำไส้และอาจเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคในการผลิตสุกร ยกตัวอย่างเช่น สุกรมีความเครียดมากในช่วงการหย่านมและหลังหย่านม การให้อาหารกับลูกสุกรเป็นปัจจัยหนึ่งที่จะนำไปสู่การติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งที่ผ่านมาหลังจากการหย่านมจะมีการป้องกันการติดเชื้อโดยการใช้ยาปฏิชีวนะผสมลงในอาหาร ซึ่งสหภาพยุโรปมีข้อกำหนดในการใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์ ทางเลือกใหม่ที่ได้มีการศึกษาอย่างต่อเนื่องคือ การใช้โปรไบโอติกเข้าไปควบคุมและลดปริมาณเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร โดยแนวทางการศึกษาถึงศักยภาพของโปรไบโอติกที่เข้าไปในร่างกายของสุกรซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในสัตว์ปีก (Gaggia et al., 2010)

สายพันธุ์ของ *Bifidobacterium* spp. ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางเพื่อเป็นโปรไบโอติกสำหรับมนุษย์ แต่ในสัตว์มีการศึกษาน้อยและมักจะศึกษาร่วมกับ *Lactobacillus* โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสุกร การให้ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* spp. ทันทีหลังคลอดจะส่งเสริมและเป็น

ประโยชน์ โดยเชื้อจะไปยึดเกาะกับเยื่อเมือกและลดการติดเชื้อในลูกสุกรแรกเกิด จะช่วยลดความรุนแรงของการติดเชื้อหรือลดปริมาณเชื้อ *Clostridium perfringens* ที่ก่อให้เกิดโรค นอกจากนี้การใช้ *B. lactis* ร่วมกับ *L. rhamnosus* จะช่วยลดการติดเชื้อ *Salmonella* spp., *E. coli* และ *Clostridium* spp. ที่ยึดเกาะเยื่อเมือกในลำไส้ของสุกรได้ (Gaggia et al., 2010)

3.2 ไก่ การปรับตัวในช่วงที่มีการฟักไข่และการเพิ่มขึ้นของความเครียดที่สืบเนื่องมาจากกระบวนการผลิตไก่เนื้อที่ทันสมัย เช่น การเปลี่ยนอาหารหรือความสมดุล การขนส่ง กระบวนการจัดการฟาร์มและความแออัดในฟาร์มอาจส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันและทำให้ไก่เกิดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารซึ่งส่งผลต่อความปลอดภัยในอาหารของผู้บริโภค การศึกษาเชื้อก่อโรคในไก่ส่วนใหญ่จะเน้นที่ *Salmonella* spp. โดยจะศึกษาความสามารถในการติดเชื้อในไก่และความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนในห่วงโซ่อาหาร การใช้ยาปฏิชีวนะหรือวัคซีนมีข้อจำกัดหลายอย่าง โปรไบโอติกจึงได้รับความสนใจศึกษาเพื่อที่จะนำมาใช้ในการควบคุมการติดเชื้อก่อโรค *Lactobacillus* เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ได้รับความนิยมมากที่สุดในการศึกษาและพัฒนาการใช้เป็นโปรไบโอติก แต่ปัจจุบันมีความสนใจที่จะศึกษากลุ่ม *E. faecium* และ *Bifidobacterium* spp. มากขึ้นแต่การใช้ *Bifidobacterium* spp. ในการควบคุมเชื้อก่อโรคยังไม่ได้รับการศึกษามากนัก ส่วนใหญ่จะเน้นที่จะศึกษาถึงประสิทธิภาพในด้านที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของไก่ การใช้เติมลงในอาหารเพื่อปรับปรุงคุณภาพของเนื้อไก่ เช่น การเพิ่ม *B. animalis* ในอาหารและน้ำให้ไก่กิน พบว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น หรือการใช้ *B. thermophilus* ร่วมกับ *L. acidophilus , L. casei* และ *E. faecium* พบว่าสามารถลดค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงไก่ไข่ เพิ่มผลผลิตไข่และมีคุณภาพมากขึ้น (Gaggia et al., 2010)

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปิยะมาศ ศรีภูมิ และคณะ (2548) คัดแยก Bifidobacteria จากอุจจาระเด็กทารกเพื่อใช้เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติก โดยแยกแบคทีเรียได้ 167 ไอโซเลต จากอุจจาระเด็กทารกจำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 127 ไอโซเลต ที่มีคุณสมบัติพื้นฐานทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาสอดคล้องกับเชื้อกลุ่ม Bifidobacteria เมื่อทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะแวนโคมัยซิน พบว่าแบคทีเรียจำนวน 30 ไอโซเลต ไม่ดื้อต่อยาที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และได้ทำการจัดจำแนกแบคทีเรียด้วยเทคนิค PCR พบว่าแบคทีเรียทั้ง 30 ไอโซเลต ให้ผล PCR ขนาด 520 เบส เมื่อสุ่มตัวอย่าง 3 ไอโซเลต คือ BK1, Su34 และ SU 35 มาวิเคราะห์ลำดับเบสบางส่วนของ 16S rDNA พบว่า BK1 มีลำดับเบสเหมือนกับ *B. animalis* 98 เปอร์เซ็นต์ ส่วน SU34 และ SU 35 มีลำดับเบสเหมือนกับ *B. dentium* 97 เปอร์เซ็นต์

Bevilacqua, Ovidi, Mattia, Trovatelli, and Canganella (2003) ได้คัดแยกเชื้อ *Bifidobacterium* spp. จากอุจจาระมนุษย์ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค โดยแยกเชื้อได้ 281 สายพันธุ์ จากอุจจาระมนุษย์ที่อายุแตกต่างกัน (เด็ก 0-14 ปี, ผู้ใหญ่ 15-50 ปี, ผู้สูงอายุ มากกว่า 50 ปีขึ้นไป) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่เติม cystein 0.5 เปอร์เซ็นต์ ทำการศึกษาสัณฐานวิทยาและทดสอบ fructose 6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) เพื่อยืนยันว่าเป็นจีนัส Bifidobacterium เลือกสายพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบมาศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรค *E. coli, S.* Typhimurium*, S. lentus*, *E. faecalis, Acinetobacter calcoaceticus, Sphingomonas paucimobilis, Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica, B. cereus* และ *C. sporogenes* พบว่า *Bifidobacterium* spp. ในรูปเซลล์ปกติ (spot test) สามารถยับยั้ง *C. sporogenes* คิดเป็น 2-3 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าใช้ supernatant (wells in agar medium) สามารถยับยั้งได้ 6 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* และ *B. cereus* ได้คิดเป็น 1-2.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Y. enterocolitica* ได้

Lee, Yu, and Heo (2003) ได้ศึกษาและคัดแยกเชื้อ Lactic acid bacteria (LAB) ที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อก่อโรค *C. difficile* โดยคัดแยกเชื้อจากอุจจาระของทารกในประเทศเกาหลีที่มีสุขภาพดี จำนวน 32 คน คัดแยกได้จำนวน 109 สายพันธุ์ จากนั้นทำการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อก่อโรค *C. difficile*, *Escherichia coli* O157: H7 และ *S. aureus* พบว่ามี 12 สายพันธุ์ จาก 109 สายพันธุ์ ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *C. difficile* และ 19 สายพันธุ์ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157: H7 แต่ไม่มีสายพันธุ์ใดที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ และพบว่ามีเพียง 4 สายพันธุ์ คือ YL-55, YL-67, YL-70 และ YL-74 ที่สามารถยับยั้งได้ทั้ง *C. difficile* และ *E. coli* O157: H7 ในจำนวน 12 สายพันธุ์ที่ยับยั้ง *C. difficile* พบว่ามี 4 สายพันธุ์ ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Streptococcus species จึงนำ 8 สายพันธุ์ที่เหลือมาศึกษาด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ Bifidobacterium และ *Lactobacillus* species พบว่าให้ผลการทดสอบเป็น *Lactobacillus* species จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ FBL-33, FBL-70 และ FBL-74 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *L. salivarius* 94 เปอร์เซ็นต์ และ *Bifidobacterium* species จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ FBL-22, FBL-35, FBL-77, FBl-83 และ FBL-84 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับ *B. infantis* 98-99 เปอร์เซ็นต์

Liu et al. (2007) ได้คัดเลือก Bifidobacteria ที่สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ จำนวน 38 สายพันธุ์ โดยใช้อาหาร MRSC broth (pH 3.0) พบว่ามี 14 สายพันธุ์ ที่สามารถทนต่ออาหารที่เติม 0.3 เปอร์เซ็นต์ ของเกลือน้ำดี ในจำนวนนี้มี 6 สายพันธุ์ที่สามารถอยู่รอดได้ในอาหาร MSRC pH 3.0 ที่มีการเติม 1-20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ของเกลือน้ำดี ซึ่งจากการศึกษาความสามารถในการทนต่อสภาพแวดล้อมในกระเพาะอาหารและลำไส้ พบว่าแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถแตกต่างกัน โดย *B. breve* A04 มีอัตราการอยู่รอดและอาจมีศักยภาพในการใช้เป็นโปรไบโอติก

Jung, Honde, Baurhoo, Zhao, and Lee (2008) ได้ศึกษาการใช้ galacto-oligosaccharide (GOS) เป็นพรีไบโอติก และใช้ *B. lactis* เป็นโปรไบโอติกในไก่เนื้อ พบว่าการใช้ GOS กระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ในมูลของไก่เนื้อ โดยจุลินทรีย์กลุ่ม anaerobe ทั้งหมดและ lactobacillus เพิ่มขึ้นถึง 3.4 และ 3.56 เท่า ตามลำดับ ในไก่เนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มี GOS (3 กิโลกรัมต่อ 25 กิโลกรัม) และ *B. lactis* ที่อายุ 40 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าจำนวน Bifidobacteria ในไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มี GOS มีปริมาณ *B. lactis* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเพิ่มขึ้นถึง 21 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพิ่มความเข้มข้นของ GOS ในอาหารจะช่วยเพิ่มปริมาณ Bifidobacteria ได้ *($P < 0.05$)* และปริมาณ Bifidobacteria จะเพิ่มขึ้นมากในไก่ที่ได้รับอาหารที่ประกอบด้วย GOS และ Bifidobacteria เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ Bifidobacteria เพียงอย่างเดียว *($P < 0.05$)* ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการใช้ GOS ร่วมกับ *B. lactis* จะช่วยสนับสนุนการเจริญของจุลินทรีย์ในลำไส้โดยเฉพาะกลุ่ม Bifidobacteria ในไก่เนื้อได้

Modesto et al. (2009) ได้คัดเลือก *Bifidobacterium* spp. สายพันธุ์ใหม่และ non-digestible oligosaccharides (NDO) ที่สามารถช่วยเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ในลำไส้และหาปริมาณการใช้โปรไบโอติกที่ดีที่สุดในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของลูกสุกรหลังหย่านมพบว่า 2 สายพันธุ์ของ *B. animalis* subsp. *lactis* (m354 และ Ra 18) และ 1 สายพันธุ์ของ *B. choerinum* (su981) สามารถเพิ่มจำนวนใน caecum ของสุกรได้ จากการทดลองพบว่าอาหารเสริมที่ต่างกันได้แก่ อาหารที่มีการเติม galacto-oligosaccharide จากหางนม (1 เปอร์เซ็นต์) และ 2- fructo-oligosaccharide จากอินนูลินและ sugar beeet (SbFOS) (4 เปอร์เซ็นต์) ไม่มีผลต่อปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารแต่การให้ SbFOS (4 เปอร์เซ็นต์) พบแนวโน้มการเพิ่มจำนวนของ *Bifidobacterium* spp. และพบว่าการให้ *B. animalis* subsp. *lactis* (Ra 18) สามารถช่วยเพิ่มน้ำหนักลูกสุกรได้ แต่ *B. choerinum* (su981) ไม่สามารถช่วยเพิ่มน้ำหนักลูกสุกร จากผลการศึกษาพอสรุปเป็นแนวทางได้ว่าควรเลือกใช้ *B. animalis* subsp. *lactis* (Ra 18) ที่ปริมาณเชื้อ 10^{11} cfu ต่อตัวต่อวัน เป็นทางเลือกที่ดีที่สุดในการเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของลูกสุกรหลังหย่านมได้

Endo, Futagawa Endo, and Dicks (2010) ได้ศึกษาความหลากหลายของ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* spp. ในมูลของสัตว์กินพืช (herbivores) สัตว์กินพืชและสัตว์ (omnivores)

และสัตว์กินเนื้อ (carnivores) โดยทำการศึกษาในสัตว์ 26 ชนิด (16 สปีชีส์) พบ Lactobacillus ได้น้อยในสัตว์กินพืช ส่วนมากจะพบในสัตว์กินเนื้อและพบได้บ้างในสัตว์กินทั้งพืชและสัตว์ ส่วน *Bifidobacterium* spp. พบ 4 สปีชีส์ ในสัตว์กินพืชและพบ 2 สปีชีส์ในสัตว์กินเนื้อ โดยสายพันธุ์ *B. pseudolongum* เป็นสายพันธุ์เดียวที่พบในสัตว์กินพืช ส่วนอีก 2 สายพันธุ์ที่พบในสัตว์กินพืชและสัตว์กินเนื้อไม่สามารถทราบสปีชีส์ได้ และอาจจะเป็นสปีชีส์ใหม่

Santini et al. (2010) ได้ศึกษาการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกเพื่อช่วยลดจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารสัตว์ โดยนำ Lactic acid bacteria และ Bifidobacteria จำนวน 55 สปีชีส์ มาทดสอบคุณสมบัติด้านต่าง ๆ เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในการยับยั้ง *Campylobacter* ในไก่ โดยจากการทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค *C. jejuni* จำนวน 3 สายพันธุ์ พบว่ามี 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* PSC 20 และ *B. longum* PCB 133 ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมจึงถูกนำไปทดลองกับไก่ที่มีสุขภาพดี ปรากฏว่าตรวจไม่พบ *L. plantarum* PSC 20 ในมูลไก่แต่พบว่า *B. longum* PCB 133 มีจำนวนเพิ่มขึ้นภายหลังจากการให้ *B. longum* PCB 133 ไป 2 สัปดาห์ และพบว่า *C. jejuni* ในมูลไก่มีปริมาณลดลงหลังจากไก่ได้รับ *B. longum* PCB 133 เข้าไป ดังนั้น *B. longum* PCB 133 จึงเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกและการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค Campylobacter จากการทดลองในห้องปฏิบัติการและการทดลองภาคสนามแสดงให้เห็นว่า *B. longum* PCB 133 เป็นจุลินทรีย์ทางเลือกที่สามารถนำมาเติมในอาหารสัตว์สำหรับการเลี้ยงสัตว์ปีกเพื่อช่วยลดการเกิด Camphylobacteriosis ในคนได้

Seifert et al. (2011) ได้ศึกษาผลของจุลินทรีย์โปรไบโอติกสายพันธุ์ *B. longum* PCB133 ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของไก่งวงภายใต้สภาวะต่าง ๆ ในฟาร์ม ในการทดลองได้ใช้ไก่งวงเพศผู้อายุ 2 สัปดาห์ โดยสุ่มตัวอย่างเป็นกลุ่ม control และกลุ่มทดลองที่ได้รับโปรไบโอติก กลุ่มละ 25 ตัว โดยไก่งวงกลุ่มทดลองจะได้รับ *B. longum* PCB133 (ปริมาณเชื้อ $3x10^7$ cfu/วัน) เป็นเวลา 5 สัปดาห์ และฆ่าไก่ที่อายุ 7 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าการให้ *B. longum* PCB133 ในไก่งวงอายุ 2 สัปดาห์ ไม่สามารถส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสัตว์ให้เพิ่มขึ้นได้

Bunesova, Vikova, Killer, Rada, and Rockova (2012) ได้คัดแยกเชื้อ *Bifidobacterium* spp. จากมูลของลูกแกะอายุระหว่าง 25-40 วัน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase phytone yeast extract (TYP) agar ที่เติม mypirocin และ acetic acid พบว่าสามารถคัดแยกได้ 19 สายพันธุ์ แบ่งได้เป็น 6 กลุ่ม จากลักษณะที่แตกต่างกันโดยการทดสอบด้วย API 50 CHL และ RAPID ID 32 นำแต่ละสปีชีส์มาหาลำดับเบส 16s rDNA และ nsp60 พบว่ามีสปีชีส์ที่เหมือนกัน

อยู่ 4 สปีชีส์ คือ *B. animalis, B. choerinum, B. pseudolongum* และ *B. pseudocatenulatum* ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า *Bifidobacterium* spp. สามารถเข้าไปอยู่ในลำไส้ของลูกแกะทางน้ำนม และมีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกสำหรับลูกแกะได้และเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ สามารถใช้แยก *Bifidobacterium* spp. ในลูกแกะแรกเกิดได้

Strompfova et al. (2014) ได้ศึกษาการให้ *B. animalis* B/12 (10^9 cfu) กับสุนัขที่มีสุขภาพดี โดยการเติมเชื้อลงไปในอาหารสุนัขเป็นเวลานาน 14 วัน แล้วเก็บตัวอย่างมูลสุนัขมาวิเคราะห์ในช่วงระหว่าง 49 วัน พบว่ามูลสุนัขในกลุ่มทดลองที่ได้รับ *B. animalis* B/12 มีปริมาณ Lactic acid bacteria สูงมากในวันที่ 7 และมีปริมาณแบคทีเรีย Coliform ต่ำ (ในวันที่ 14, 21, 28, 49) เมื่อเปรียบเทียบกับมูลสุนัขในกลุ่มควบคุม ความเข้มข้นของกรอะซิติก (วันที่ 7, 21, 28, 49) acetoacetic (วันที่ 7-49) และ valaric acid (วันที่ 14) ในมูลสุนัขกลุ่มทดลองมีปริมาณสูง ซึ่งตรงข้ามกับ formic acid (วันที่ 7-21) ที่มีปริมาณลดลงหลังจากได้รับอาหารที่มี *B. animalis* B/12 ส่วนในซีรัมของกลุ่มทดลองมีความเข้มข้นของ triglyceride (วันที่ 14) และ albumin ต่ำลง (วันที่ 14, 28, 49) ในขณะที่มีระดับของ alanine aminotransferase (วันที่ 14) และ alkalinephosphatase (วันที่ 14, 28) ที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

Lian, Hsiao, and Chou (2002) ศึกษาการรอดชีวิตภายหลังจากกระบวนการ spray drying ของ *B. infantis* CCRC 14633, *B. infantis* CCRC 14661, *B. longum* ATCC 15708, *B. longum* CCRC 14634 และ *B. longum* B6 โดยทำการ spray dry โดยใช้ carrier media ที่แตกต่างกัน ได้แก่ gelatin, gum arabic, soluble starch และ skim milk ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *B. longum* B6 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุด (82.6 %) หลังจากผ่านกระบวนการ spray drying ในสภาวะที่ใช้ skim milk เป็น carrier media และอุณหภูมิของ outlet air ที่ 50 องศาเซลเซียส ทำให้เซลล์รอดชีวิตได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับอุณหภูมิ 55 และ 60 องศาเซลเซียส

Dianawati, Mishra, and Shah (2013) ศึกษาโปรตีน 5 ชนิดและน้ำตาล 3 ชนิด ในการปกป้อง *B. longum* 1941 จากกระบวนการ freeze drying ตลอดจนการศึกษาการทนกรดและทนน้ำดี โดยใช้ Sodium caseinate (CAS) 12 %, โปรตีนหางนม (WPC) 12 %, Sodium caseinate (CAS): โปรตีนหางนม (WPC) อัตราส่วน 6%: 6%, skim milk (SM) 12 %, โปรตีนถั่วเหลือง (SPI) 12 % ร่วมกับการใช้ glycerol (GLY) (3% w/v), mannitol (MAN) (3% w/v) หรือ maltodextrin (MD) (3% w/v) เป็น emulsion system โดยในการทดลองได้ใช้ *B. longum* 1941 ผสมกับ emulsion system แต่ละชนิดในอัตราส่วน 1:4 (แบคทีเรีย : emulsion system) และนำเข้าสู่กระบวนการ freeze drying พบว่าเมื่อใช้ CAS-MAN เป็น emulsion system *B. longum* 1941

มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูง โดยมีค่าเท่ากับ 97.4 %, 81.6 % และ 99.3 % หลังจากผ่านกระบวนการ freeze drying การสัมผัสกับกรดและน้ำดี ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์ *B. longum* 1941 ที่ไม่ผสมกับ emulsion system ใด ๆ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังผ่านกระบวนการ freeze drying การสัมผัสกับกรดและน้ำดีประมาณ 55%, 10% และ 45% ตามลำดับ

Pinto et al. (2015) ศึกษาคุณสมบัติของ *Bifidobacterium* BB-12 ที่ถูกห่อหุ้ม (microencapsulate) ด้วยหางนมเหลวหรือ whey retentate ที่ได้จากการกรอง (nanofiltration) และผสมกับ inulin หรือ polydextrose พบว่า *Bifidobacterium* BB-12 สามารถรอดชีวิตได้หลังจากผ่านกระบวนการ encapsulation ด้วยวิธี spray drying (อุณหภูมิของ outlet air เท่ากับ 50±3 องศาเซลเซียส) โดยมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลง 0.42-0.77 log CFU/g เมื่อเทียบกับเซลล์ที่รอดชีวิตก่อนกระบวนการ spray drying

Tanimono et al. (2016) ศึกษา *B. crudilactis* FR 62/b/3 ซึ่งแยกได้จากนมดิบและชีส โดยศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อในระดับสเกลใหญ่ และศึกษาความคงตัวในสูตรการผลิตแบบแห้ง พบว่า *B. crudilactis* FR 62/b/3 สามารถเจริญได้ดีที่ pH 5.0 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส pH 5.0 พบว่าเซลล์เจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่เวลา 22 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์และน้ำหนักเซลล์แห้งโดยเฉลี่ยเท่ากับ $8.3x10^{9}$ cfu/ml และ 2.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาความทนของ *B. crudilactis* FR 62/b/3 ต่อกระบวนการ freeze-drying และผลของ cryoprotectants ที่แตกต่างกัน พบว่า sorbitol เหมาะสมที่สุดที่จะใช้เป็นสาร cryoprotectant (เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 80.5±15.8) โดยมีปริมาณเซลล์ก่อนและหลังกระบวนการ freeze drying เท่ากับ $3.4x10^{11}$±0.6 และ $2.7x10^{11}$±0.5 cfu/ml ตามลำดับ และในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่า sorbitol และ sucrose ช่วยทำให้เซลล์รอดชีวิตได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 54.9 และ 50.1 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม *B. crudilactis* FR 62/b/3 ที่ไม่ได้ผสมกับ cryoprotectants มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตหลังผ่านกระบวนการ freeze-drying เพียงแค่ 10.5±1.2

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1.1 เครื่องมือ

1.1.1 Autoclave (ประเทศไทย)

1.1.2 Hot air oven (Termaks, Norway)

1.1.3 Incubator (Termaks, Norway)

1.1.4 Water bath (LAUDA DR.R.WOBSER GmbH & Co.kG, LAUDA,ประเทศเยอรมนี)

1.1.5 pH meter (Mettler-Toledo (schweiz) AG, Mettler Toledo, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

1.1.6 กล้องจุลทรรศน์ (OLYMPUS Corporation, OLYMPUS, ประเทศญี่ปุ่น)

1.1.7 เครื่อง Centrifuge (Sartorius AG, Sartorius, ประเทศเยอรมนี)

1.1.8 เครื่อง Centrifuge (Hermle Labortechnik GmbH, Hermle, ประเทศเยอรมนี)

1.1.9 เครื่อง Spin down (Fotodyne incorporation, ประเทศแคนาดา)

1.1.10 เครื่อง UV Transilluminator (Spectroline®, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

1.1.11 เครื่อง Thermal Cycler (T Gradient, Biometra®, ประเทศเยอรมนี)

1.1.12 เครื่อง Gel Electrophoresis apparatus (Labnet International, EnDURO™, ประเทศไต้หวัน)

1.1.13 เครื่อง Vortex mixer (LMS, ประเทศญี่ปุ่น)

1.1.14 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo (schweiz) AG, Mettler Toledo, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

1.1.15 เครื่อง Spectrophotometer (Thermo Electron corporation, Genesys 20, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

1.2 วัสดุอุปกรณ์

1.2.1 AnaeroPack Rectangular Jar ขนาด 2.5 ลิตร และ 7 ลิตร (Mitsubishi Gas Chemical, MGC, ประเทศญี่ปุ่น)

1.2.2 ซองผลิตแก๊สเพื่อเลี้ยงเชื้อ Anaerobes (Mitsubishi Gas Chemical, AnaeroPack®-Anaero, ประเทศญี่ปุ่น)

1.2.3 Oxygen Indicator (Mitsubishi Gas Chemical, MGC, ประเทศญี่ปุ่น)

1.2.4 Autopipett ขนาด P10, P20, P200, P1000 (Sartorius corporate Administration GmbH, Biohit Proline, ประเทศเยอรมนี)

1.2.5 Pipett ขนาด 1 มิลลิลิตร, 5 มิลลิลิตร, 10 มิลลิลิตร

1.2.6 จานแก้วเพาะเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90-100 มิลลิเมตร

1.2.7 ขวด Duran ขนาด 100 มิลลิลิตร, 250 มิลลิลิตร, 500 มิลลิลิตร, 1000 มิลลิลิตร

1.2.8 ขวดแก้วใส ขนาด 250 มิลลิลิตร, 500 มิลลิลิตร

1.2.9 หลอดทดลองขนาด 16x100 มิลลิเมตร, 16x150 มิลลิเมตร

1.2.10 หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16x150 มิลลิเมตร

1.2.11 Microcentrifuge tube

1.2.12 หลอด cryo vial

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3.1 Bifidobacterium medium (BM agar) (ที่เติม Bifido selective supplement A (FD250))

1.3.2 Bifidobacterium medium (BM agar)

1.3.3 Bifidobacterium medium broth (BM broth)

1.3.4 20 % glycerol ใน BM broth

1.3.5 Lactic Bacteria Differential agar (Himedia, ประเทศอินเดีย)

1.3.6 Mueller Hinton agar (MHA agar) (Merck, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

1.3.7 Nutrient agar (NA agar)

1.3.8 Tryptic soy broth (Himedia, ประเทศอินเดีย)

1.3.9 Anaerobic dilution buffer

1.3.10 Phosphate buffer saline (PBS)

1.3.11 Buffered Nitrate-Motility medium

1.3.12 Nitrate broth

1.3.13 1 % glucose ใน BM broth

1.3.14 Brain Heart Infusion broth (BHI) (Merck, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

1.3.15 Thioglycollate broth (Himedia, ประเทศอินเดีย)

1.4 สารเคมี

1.4.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.4.1.1 Bromocresol green ($C_{21}H_{14}Br4O_5S$) (Fisher Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

1.4.1.2 Bifido selective supplement A (FD250) (Himedia laboratories Pvt. Ltd., Himedia, ประเทศอินเดีย)

1.4.1.3 Bromocresol purple ($C_{21}H_{16}Br_2O_5S$) (Ajax Finechem Pty Ltd., Labchem, ประเทศนิวซีแลนด์)

1.4.1.4 Calcium chloride dehydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.1.5 D-fructose-6-phosphate disodium salt hydrate ($C_6H_{11}Na_2O_9P \cdot xH_2O$) (Sigma Aldrich, sigma, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

1.4.1.6 D-Galactose ($C_6H_{12}O_6$) (Ajax Finechem Pty Ltd., Labchem, ประเทศนิวซีแลนด์)

1.4.1.7 Glycerol (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.22 L-ascorbic acid ($C_6H_8O_6$) (Ajax Finechem Pty Ltd., Labchem, ประเทศนิวซีแลนด์)

1.4.1.8 L-cysteine hydrochloride monohydrate ($C_3H_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$) (Amresco®, amresco, ประเทศแคนาดา)

1.4.1.9 Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.1.10 Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.1.11 Manganese (II) sulfate monohydrate ($MnSO_4 \cdot H_2O$) (Scharlab S.L., SCHARLAU, ประเทศสเปน)

1.4.1.12 Potassium chloride (KCl) (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.1.13 Potassium nitrate (KNO_3) (Ajax Finechem Pty Ltd., Labchem, ประเทศนิวซีแลนด์)

1.4.1.14 Resazurin tablets (VWR chemicals, BHD, ประเทศเบลเยี่ยม)

1.4.1.15 Sodium chloride (NaCl) (Ajax Finechem Pty Ltd., Labchem, ประเทศนิวซีแลนด์)

1.4.1.16 di-Sodium hydrogen phosphate dehydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.1.17 Sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) (Ajax Finechem Pty Ltd., Labchem, ประเทศนิวซีแลนด์)

1.4.1.18 Tween 80 (Ajax Finechem Pty Ltd., Labchem, ประเทศนิวซีแลนด์)

1.4.2 สารเคมีสำหรับการย้อมแกรมและย้อมสปอร์

1.4.2.1 Ammonium oxalate ($C_2H_8N_2O_4$) (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.2.2 Crystal violet ($C_{25}H_{30}CIN_3$) (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.2.3 Ethanol (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.2.4 Iodine (Carloerba Reagents S.r.l., Carlo ERBA, ประเทศอิตาลี)

1.4.2.5 Malachite green ($C_{52}H_{54}N_4O_{12}$) (Panreac Quimica S.L.U., Panreac, ประเทศสเปน)

1.4.2.6 Potassium iodide (KI) (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.2.7 Safranin O ($C_{20}H_{19}CIN_4$) (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.3 สารเคมีสำหรับการทดสอบชีวเคมี

1.4.3.1Acetic acid, Glacial (CH_3COOH) (J.T.Baker Neutrasorb, J.T.Baker, ประเทศไทย)

1.4.3.2 D-Fructose ($C_6H_{12}O_6$) (Ajax Finechem Pty Ltd., Labchem, ประเทศนิวซีแลนด์)

1.4.3.3 Hydrogen peroxide (H_2O_2) (Bright chem. SDN BHD, QReC^{TM}, ประเทศนิวซีแลนด์)

1.4.3.4 Hydrochloric acid (HCl) (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.3.5 Hydroxylamine. Hydrochloride ($NH_2OH \cdot HCl$) (Sigma Aldrich, sigma , ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

1.4.3.6 Iron (III) chloride hexahydrate ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) (Sigma Aldrich, sigma , ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

1.4.3.7 α-naphthol ($C_{10}H_7OH$) (Asia Pacific Specialty chemicals limited, Univar, ประเทศออสเตรีย)

1.4.3.8 NA iodoacetate ($C_2H_2INaO_2$) (Sigma Aldrich, sigma , ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)

1.4.3.9 di-Potassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4) (Ajax Finechem Pty Ltd., Labchem, ประเทศนิวซีแลนด์)

1.4.3.10 Potassium hydrogen orthophosphate (KH_2PO_4) (Ajax Finechem Pty Ltd., Labchem, ประเทศนิวซีแลนด์)

1.4.3.11 Sodium carbonate (Na_2CO_3) (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.3.12 Sodium fluoride (NaF) (Ajax Finechem Pty Ltd., Labchem, ประเทศนิวซีแลนด์)

1.4.3.13 Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$) (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.3.14 Sulfanilic acid ($C_6H_7NO_3S$) (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.3.15 Trichloroacetic acid (TCA) (Carloerba Reagents S.r.l., Carlo ERBA, ประเทศอิตาลี)

1.4.3.16 *N,N,N,'N'*-Tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride ($C_6H_4[N(CH_3)_2]_2 \cdot 2HCl$) (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.3.17 Zinc dust (Zn) (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.4 สารเคมีที่ใช้สกัดดีเอ็นเอและ PCR

1.4.4.1 EDTA free acid,ACS ($C_{10}H_{16}N_2O_8$) (Himedia laboratories Pvt. Ltd., Himedia, ประเทศอินเดีย)

1.4.4.2 Lysozyme (Himedia laboratories Pvt. Ltd., Himedia, ประเทศอินเดีย)

1.4.4.3 Sodium hydroxide (NaOH) (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.4.4 Tris ($C_4H_{11}NO_3$) (Amresco® , amresco, ประเทศแคนาดา)

1.4.4.5 Triton X-100 ($C_4H_{11}NO_3$) (Amresco®, amresco, ประเทศแคนาดา)

1.4.4.6 Taq DNA Polymerase, Recombinant (Invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

1.4.4.7 10 mM dNTP Mix (Invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

1.4.4.8 100 bp DNA LADDER (Invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

1.4.4.9 PureLink™ Genomic DNA mini kits (Invitrogen Life Technologies corporation, Invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

1.4.4.10 PureLink™ Quick PCR Purification kit (Thermo Fisher scientific, Invitrogen, ประเทศเยอรมนี)

1.4.5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ Agarose gel electrophoresis

1.4.5.1 Agarose (Invitrogen Life Technologies corporation, Invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

1.4.5.2 Bromophenol blue ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$) (Amresco® , amresco, ประเทศแคนาดา)

1.4.5.3 Ethidium bromide ($C_{21}H_{20}BrN_3$) (Amresco® , amresco, ประเทศแคนาดา)

1.4.5.4 Xylene cyanol FF ($C_{25}H_{21}N_2O_6S_2Na$) (Amresco®, amresco, ประเทศแคนาดา)

1.4.6 Oxgall (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.4.7 Pepsin (Merck KGaA, Merck, ประเทศเยอรมนี)

1.5 ดิสก์ยาปฏิชีวนะ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

1.5.1 Amoxycillin (10 µg) (AML)

1.5.2 Erythromycin (15 µg) (E)

1.5.3 Gentamicin (10 µg) (CN)

1.5.4 Neomycin (30 µg) (N)

1.5.5 Sulphamethoxazole (25 µg) (STX)

1.5.6 Fosfomycin (50 µg) (FOS)

1.5.7 Colistin sulphate (10 µg) (CT)

1.5.8 Lincomycin (2 µg) (MY)

1.5.9 Enrofloxacin (5 µg) (ENR)

1.5.10 Doxycyclin (30 µg) (DO)

1.5.11 Lincomycin 109 (109 µg) (LS)

1.5.12 Oxytetracycline (30 µg) (OT)

2. เชื้อจุลินทรีย์

2.1 ศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

1) *Salmonella* Enteritidis DMST 15676

2) *Salmonella Typhimurium* DMST 15674

3) *Escherichia coli* ATCC 25922

4) *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048

5) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

2.2 ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

1) *Bacillus subtilis* ATCC 6633

2) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

3) *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527

3. ตัวอย่างที่ศึกษา

ตัวอย่างที่ทำการศึกษาแยกเป็นตัวอย่างจากเด็กทารก ไก่และสุกร โดยเก็บตัวอย่างระหว่างเดือนธันวาคม 2558 ถึงเดือนมีนาคม 2559 มีรายละเอียดดังนี้

3.1 อุจจาระเด็กทารก เก็บตัวอย่างจากเด็กทารกแรกเกิดถึง 5 เดือน จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างในเขตพื้นที่ อำเภอเมืองชลบุรีและอำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี

3.2 ไก่ โดยเก็บตัวอย่างจากไก่ในจังหวัดชลบุรี แยกจากอวัยวะส่วนต่าง ๆ (อวัยวะละ 10 ตัวอย่าง) ดังนี้

3.2.1 ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum)

3.2.2 ลำไส้เล็กส่วนกลาง (Jejunum)

3.2.3 ลำไส้เล็กส่วนปลาย (Ileum)

3.2.4 ไส้ตัน (Ceacum)

3.3 สุกร โดยเก็บตัวอย่างจากฟาร์มหมูในจังหวัดบุรีรัมย์ โดยเก็บตัวอย่าง (ตัวอย่างละ 10 ตัวอย่าง) ดังนี้

3.3.1 น้ำนมแม่สุกร

3.3.2 มูลของลูกสุกร

3.3.3 มูลแม่สุกร

4. การเก็บตัวอย่าง การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp. และการเก็บรักษาแบคทีเรียที่คัดแยกได้

4.1 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง

4.1.1 อุจจาระเด็กทารก เก็บตัวอย่างจากเด็กทารกแรกเกิดถึง 5 เดือน จำนวน 10 ตัวอย่าง

4.1.1.1 เก็บตัวอย่างโดยใช้ cotton swab ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ป้ายอุจจาระเด็กทารก (จากผ้าอ้อมเด็ก) ประมาณ 1-2 กรัม (ประมาณ ½ ช้อนชา) ใส่ไม้ swab ลงในอาหาร Thioglycollate broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุในหลอดเก็บตัวอย่างฝาเกลียวจนถึงก้นหลอด แล้วหักปลายไม้ด้านบนกับปากหลอดฝาเกลียวทิ้งไป ปิดฝาเกลียวให้สนิท

4.1.1.2 ใช้ parafilm พันรอบ ๆ ฝาหลอดเก็บตัวอย่าง

4.1.1.3 บรรจุหลอดเก็บตัวอย่างในถุงพลาสติกชนิดซิบล็อค พร้อมเขียนรายละเอียดการเก็บตัวอย่าง ได้แก่ ชื่อ-สกุลของผู้ปกครอง วันและเวลาที่เก็บตัวอย่าง ลงในป้ายกำกับตัวอย่างที่ติดอยู่บนถุงพลาสติกชนิดซิบล็อค ใช้หนังยางรัดปากถุง

4.1.1.4 วางถุงพลาสติกบรรจุหลอดตัวอย่างในตะกร้าขนาดเล็ก บรรจุตะกร้าตัวอย่างลงใน AnaeroPack Rectangular Jar ที่มีซองผลิตแก๊สเพื่อเลี้ยงเชื้อ anaerobes และ Oxygen Indicator ปิดฝาให้สนิท

4.1.2 ไก่ เก็บตัวอย่างจากไก่ (ที่เสียชีวิตแล้ว โดยซื้อไก่ทั้งตัวที่ชาวบ้านฆ่าและถอนขนออกแล้วแต่ยังมีอวัยวะภายในครบถ้วนที่นำมาขายที่ตลาด)

4.1.2.1 เก็บตัวอย่างไก่ทั้งตัวใส่ในถุงพลาสติกที่สะอาด ใช้หนังยางรัดปากถุงให้แน่น

4.1.2.2 เขียนรายละเอียดตัวอย่าง วัน เวลาที่เก็บ ลงในป้ายกำกับตัวอย่าง ติดป้ายที่ถุงเก็บตัวอย่าง ใส่ถุงตัวอย่างไก่ลงในกล่องโฟมที่มีฝาปิดมิดชิด ขนส่งตัวอย่างโดยรถยนต์เพื่อนำมาทำการผ่าซากเพื่อเก็บตัวอย่างอวัยวะส่วนลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum), ลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunum), ลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) และไส้ตัน (caecum) ภายในระยะเวลาไม่เกิน 3 ชั่วโมง

4.1.2.3 ผ่าซาก เก็บตัวอย่างอวัยวะไก่ส่วนต่าง ๆ ใส่ในอาหาร Thioglycollate broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวด duran ขนาด 250 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปคัดแยกเชื้อต่อไป

4.1.3 สุกร การเก็บตัวอย่างน้ำนมแม่สุกร มูลของลูกสุกร (piglet feces) และมูลแม่สุกร โดยเก็บตัวอย่างจากฟาร์มสุกรมีขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง ดังนี้

4.1.3.1 เก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกที่สะอาด ใช้หนังยางรัดปากถุงให้แน่น ใส่ถุงพลาสติกซ้อนอีก 1 ชั้น

4.1.3.2 เขียนรายละเอียดของตัวอย่าง วัน เวลาที่เก็บลงในป้ายกำกับตัวอย่างให้ชัดเจน

4.1.3.3 บรรจุตัวอย่างลงใน AnaeroPack Rectangular Jar ที่มีซองผลิตแก๊ส เพื่อเลี้ยงเชื้อ anaerobes และ Oxygen Indicator ใส่ลงไปปิดฝากล่องให้สนิท บรรจุกล่อง AnaeroPack Rectangular Jar ในกล่องโฟมที่มีฝาปิดมิดชิด นำตัวอย่างไปคัดแยกเชื้อต่อไป

4.2 ขั้นตอนการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp.

4.2.1 นำตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนการเก็บตัวอย่างมาเจือจางแบบ 10 เท่า ตามลำดับส่วน (ten-fold dilution) ด้วยสารละลาย anaerobic dilution buffer ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 ให้ได้ระดับการเจือจางเท่ากับ 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6} ตามลำดับ ปิเปตตัวอย่างที่ระดับการเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Bifidobacterium medium (BM agar) ที่เติม Bifido selective supplement A (FD250) ทำการ spread plate แล้วนำไปใส่ใน AnaeroPack Rectangular Jar ที่มีซองผลิตแก๊สเพื่อเลี้ยงเชื้อ anaerobes และ Oxygen Indicator บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.2.2 เมื่อเชื้อแบคทีเรียเจริญแล้ว คัดเลือกโคโลนีที่สงสัยที่มีลักษณะโคโลนีสีขาว ขอบเรียบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ≥ 1 มิลลิเมตร (Simpson, Stanton, Fitzgerald & Ross, 2004) ตัวอย่างละ 10-20 โคโลนี นำแต่ละโคโลนีไป streak ซ้ำบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ บ่มใน AnaeroPack Rectangular Jar ที่มีซองผลิตแก๊สเพื่อเลี้ยงเชื้อ anaerobes และ Oxygen Indicator บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.2.3 นำแบคทีเรียไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมแกรม (Gram's stain) (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2557)

4.3 ขั้นตอนการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

4.3.1 เพาะเชื้อจุลินทรีย์ลงบน BM agar slant ในหลอดทดลองฝาเกลียว บ่มใน AnaeroPack Rectangular Jar ที่มีซองผลิตแก๊สเพื่อเลี้ยงเชื้อ anaerobes และ Oxygen Indicator บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.3.2 เตรียม inoculums เชื้อแบคทีเรีย โดยใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ BM broth ที่มีกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร (เตรียมตามภาคผนวก ก) มาใส่ในหลอดที่เพาะเชื้อจุลินทรีย์ไว้ (ข้อ 4.3.1) ใช้พาสเจอร์ปิเปตขูดเชื้อเบา ๆ แล้วดูดขึ้นลงเพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์กระจายตัวออกจากกันโดยไม่จับกันเป็นกลุ่มก้อน ปิเปตใส่ในหลอด cryo vial ที่ปราศจากเชื้อ หลอดละ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (เพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป)

5. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีและอื่น ๆ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี ของแบคทีเรียในจีนัส *Bifidobacterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) รูปท่อน มีกิ่งก้านคล้ายรูปตัววี ตัววาย มีรูปร่างไม่แน่นอน บางเซลล์โค้ง บางเซลล์เป็นกระบอง การเรียงตัวมักเรียงตัวเป็นสายซ้อนกันในแนวเดียวกันคล้ายรั้ว โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Bifidobacterium* spp. จะให้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 3-1

5.1 การย้อมแกรม (Gram's stain) (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2557)

5.1.1 ใช้ loop แตะโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar ที่บ่มเพาะเชื้อภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาเกลี่ยบนสไลด์ วางทิ้งไว้ให้รอย smear แห้ง และ fix ผ่านเปลวไฟ

5.1.2 หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาที เทสีทิ้ง

5.1.3 หยด iodine solution ให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาที เท iodine solution ทิ้ง

5.1.4 หยดเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที ล้างออกด้วยน้ำทันที

5.1.5 หยดสี safranin solution ให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้นาน 15-30 วินาที และล้างด้วยน้ำและซับให้แห้ง

5.1.6 นำสไลด์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า (100X)

5.2 การย้อมเอนโดสปอร์ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2557)

5.2.1 ใช้ loop แตะโคโลนีแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar ที่บ่มเพาะเชื้อภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาเกลี่ยลงบนสไลด์ตั้งทิ้งไว้ให้รอย smear แห้ง และ fix โดยผ่านเปลวไฟ

5.2.2 หยดสี malachite green ให้ท่วมรอย smear วางสไลด์บนไอน้ำเดือดนานประมาณ 5 นาที คอยเติมสี ระวังอย่าให้สไลด์แห้ง เมื่อครบเวลาเทสีทิ้ง ทิ้งไว้ให้เย็น ล้างด้วยน้ำ

5.2.3 หยดสี safranin solution ให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีที่เหลือออกจากสไลด์และล้างด้วยน้ำ ทิ้งไว้ให้รอย smear แห้ง

5.2.4 นำสไลด์ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า (100X) เอนโดสปอร์จะติดสีเขียวของ malachite green ส่วนเซลล์ปกติจะติดสีแดงของ safranin

5.2.5 อ่านผลการทดสอบ โดยผลบวก (+) หมายถึง พบการสร้างสปอร์ และผลลบ (-) หมายถึง ไม่พบการสร้างสปอร์

ตารางที่ 3-1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Bifidobacterium* spp.

รายการทดสอบ	**ผลการทดสอบ**
การย้อมแกรม	แกรมบวก รูปท่อน มีกิ่งก้านคล้ายรูปตัววี ตัววาย มีรูปร่างไม่แน่นอน
การย้อมสปอร์	- (ไม่สร้างสปอร์)
การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test)	-
การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test)	-
การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test)	-
การรีดิวซ์ไนเตรต (Nitrate test)	-
การสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส	+
การทดสอบคุณสมบัติในการหมักน้ำตาลแบบ Homofermentative/heterofermentative	+
การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6 PPK)	+

5.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test) (Downes & Ito, 2001)

5.3.1 ใช้ loop แตะโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar ที่บ่มเพาะเชื้อภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาเกลี่ยลงบนสไลด์

5.3.2 หยด hydrogen peroxide 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนรอยเกลี่ยของเชื้อและสังเกตการเกิดฟองอากาศ

5.3.3 อ่านผลการทดสอบ โดยผลบวก (+) หมายถึง มีฟองอากาศเกิดขึ้น เนื่องจากมีกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลส ผลลบ (-) หมายถึง ไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้น (หากเกิดฟองอากาศหลังจากตั้งทิ้งไว้ 20 นาที ถือว่าเป็นผลลบ)

5.4 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) (ISO/TS 21872-2, 2007)

5.4.1 ใช้ loop แตะโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar ที่บ่มเพาะเชื้อภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาแต้มลงบนกระดาษกรองที่หยดด้วย oxidase reagent ตรวจผลภายในเวลา 10 วินาที

5.4.2 อ่านผลการทดสอบโดย ผลบวก (+) หมายถึง สีกระดาษกรองบริเวณที่แตะเชื้อเปลี่ยนเป็นสีม่วงหรือสีชมพูอมแดง เนื่องจากมีกิจกรรมของเอนไซม์ออกซิเดส ผลลบ (-) หมายถึง ไม่เปลี่ยนสี

5.5 การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test) (Health Protection Agency, SOP W5, 2005)

5.5.1 เขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar ที่บ่มเพาะเชื้อภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และทำการ stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered Nitrate-Motility medium บ่มใน AnaeroPack Rectangular Jar ที่มีซองผลิตแก๊สเพื่อเลี้ยงเชื้อ anaerobes และ Oxygen Indicator บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.5.2 อ่านผลการทดสอบโดย ผลบวก (+) หมายถึง เชื้อเจริญออกนอกแนว Stab (เชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้ โดยใช้เชื้อ *S.* Enteritidis DMST 15676 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง) และผลลบ (-) หมายถึง เชื้อเจริญตามแนว Stab (เชื้อไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยใช้เชื้อ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง)

5.6 การรีดิวซ์ไนเตรต (Nitrate test) (Health Protection Agency, SOP F15, 2005)

5.6.1 ใช้ loop แตะโคโลนีเดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar ที่บ่มเพาะเชื้อภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nitrate medium บ่มใน AnaeroPack Rectangular Jar ที่มีซองผลิตแก๊สเพื่อเลี้ยงเชื้อ anaerobes และ Oxygen Indicator บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

5.6.2 เติม sulfanilic acid reagent 0.5 มิลลิลิตร และ α-naphthol reagent 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nitrate medium

5.6.3 สังเกตสีของสารละลายหากเปลี่ยนเป็นสีแดงแสดงว่าไนเตรตถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรต์ ถ้าไม่เปลี่ยนสีให้ทำการทดสอบต่อโดยเติม zinc dust และรอประมาณ 10 นาที สังเกตสีของสารละลายว่าเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือไม่

5.6.4 อ่านผลการทดสอบโดย

ผลบวก (+) หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดงหลังจากเติม nitrate reagent (แสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์ Nitrate reductase (Reduce $NO_3 \longrightarrow NO_2$)) หรือไม่เกิดสีแดงหลังจากเติม nitrate reagent แต่เมื่อเติม zinc dust สีสารละลายไม่เปลี่ยนแปลงและมีฟองอากาศเกิดขึ้น (แสดงว่าเชื้อสามารถรีดิวซ์ Nitrate ได้อย่างต่อเนื่องจนได้เป็นก๊าซไนโตรเจน ($NO_3 \longrightarrow NO_2 \longrightarrow N_2O \longrightarrow N_2$))

ผลลบ (-) หมายถึง ไม่เกิดสีแดงหลังจากเติม nitrate reagent แต่เมื่อเติม zinc dust เกิดสีแดง (แสดงว่าเชื้อที่ทดสอบไม่สามารถสร้างเอนไซม์ Nitrate reductase ได้ เกิดจาก zinc ไปรีดิวซ์ nitrate ให้เป็น nitrite)

5.7 การทดสอบการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส (Health Protection Agency, SOP F15, 2005)

5.7.1 ใช้ loop แตะโคโลนีเดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar ที่บ่มเพาะเชื้อภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีน้ำตาลกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และมี Bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ บ่มใน AnaeroPack Rectangular Jar ที่มีซองผลิตแก๊สเพื่อเลี้ยงเชื้อ anaerobes และ Oxygen Indicator บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

5.7.2 ผลการทดสอบโดยการสังเกตความขุ่นและสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยผลบวก (+) หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นและเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเนื่องจากมีการสร้างกรด และผลลบ (-) หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีม่วงไม่เปลี่ยนแปลง

5.8 การทดสอบคุณสมบัติในการหมักน้ำตาลแบบ Homofermentative/ heterofermentative (McDonald, McFeeters, Daeschel, & Fleming, 1987)

5.8.1 ใช้ loop แตะโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar ที่บ่มเพาะเชื้อภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ lactic bacteria differential agar บ่มใน AnaeroPack Rectangular Jar ที่มีซองผลิตแก๊สเพื่อเลี้ยงเชื้อ anaerobes และ Oxygen Indicator บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

5.8.2 อ่านผลการทดสอบโดยผลบวก (+) หมายถึง โคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีขาว (Heterofermentative) และผลลบ (-) หมายถึง โคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีฟ้าหรือเขียว (Homofermentative)

5.9 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6 PPK) (Chung et al., 1999)

5.9.1 เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเพาะเชื้อในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.9.2 Centrifuge โดยใช้ความเร็ว 6000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

5.9.3 เทส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยสารละลาย 0.05 M phosphate buffer (pH 6.5) ที่เติม 0.05 เปอร์เซ็นต์ Cysteine.HCl ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แขวนลอยเซลล์แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5.9.4 เติม solution I (6 mg Sodium fluoride (NaF) และ 10 mg NA iodoacetate ($C_2H_2INaO_2$) ในน้ำ Deionized water ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร) 0.25 มิลลิลิตร และสารละลาย D-fructose-6-phosphate disodium salt hydrate ($C_6H_{11}Na_2O_9P.xH_2O$) (ความเข้มข้น 80 mg/l) 0.25 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

5.9.5 หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย Hydroxylamine.hydrochloride ($NH_2OH.HCl$) (140 mg/ml) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

5.9.6 เติม trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ HCl (ความเข้มข้น 4 โมลาร์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

5.9.7 เติม Iron (III) chloride hexahydrate ($FeCl_3.6H_2O$) (ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

5.9.8 อ่านผลการทดสอบโดยถ้าเกิดสีน้ำตาลแดงแสดงว่าให้ผลการทดสอบเป็นบวก และผลลบคือสีของสารละลายไม่เปลี่ยนแปลง

6. การสกัดดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

6.1 การสกัดดีเอ็นเอ ทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียตามขั้นตอนที่ระบุในคู่มือของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป PureLink™ Genomic DNA kits (Invitrogen) เมื่อได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำไปตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis (รายละเอียดตามข้อ 6.4)

6.2 การเพิ่มชิ้นส่วนบริเวณยีน 16s rRNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

6.2.1 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนบริเวณยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบางส่วนของยีน 16s rRNA ของจีนัส Bifidobacteria (Kok et al., 1996) ดังแสดงในตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-2 ไพรเมอร์ Bif164-f และ Bif662-r

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ความยาวของไพรเมอร์ (คู่เบส)
Bif164-f	5'-GGG TGG TAA TGC CGG ATG-3'	18
Bif662-r	5'-CCA CCG TTA CAC CGG GAA-3'	18

6.2.2 เตรียม master mix (ตารางที่ 3-3) ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่แช่ในน้ำแข็งโดยผสมรีเอเจนต์และสารต่าง ๆ (ยกเว้น DNA template) ให้เข้ากัน จากนั้นปิเปต master mix ไปใส่ใน PCR tube หลอดละ 40 ไมโครลิตร

ตารางที่ 3-3 Master mix สำหรับปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ Bif164-f และ Bif662-r

รีเอเจนท์ / ความเข้มข้นเริ่มต้น	ความเข้มข้นสุดท้าย / 1 reaction	ปริมาตร (µl) / 1 reaction	No template control	No primer control
10x buffer PCR	1X buffer	5	5	5
50 mM $MgCl_2$	1.5 mM $MgCl_2$	3	3	3
10 mM dNTP mix	0.2 mM	2	2	2
10 µM Forward primer	0.5 µM	2.5	2.5	-
10 µM Reverse primer	0.5 µM	2.5	2.5	-
Tag DNA polymerase (5U/µl)	5 U	1	1	1
Sterile D.I. water		24	34	34
DNA template		10	-	10
Total volume	50	50	50	50

6.2.3 เติม DNA template ลงไปผสมกับ master mix ใน PCR tube หลอดละ 10 ไมโครลิตร

6.2.4 ใส่ PCR tube ลงใน thermal cycler แล้วดำเนินปฏิกิริยา PCR ภายใต้สภาวะดังต่อไปนี้

ขั้นที่ 1	95 องศาเซลเซียส	5 นาที	
ขั้นที่ 2	95 องศาเซลเซียส	1 นาที	30 รอบ
	66 องศาเซลเซียส	45 วินาที	
	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
ขั้นที่ 3	72 องศาเซลเซียส	5 นาที	

6.2.5 เก็บ PCR product ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (เก็บระยะสั้น) หรือที่ -20 องศาเซลเซียส (เก็บระยะยาว)

6.2.6 ตรวจสอบขนาดที่ถูกต้องของ PCR product (ขนาด 520 bp) ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis (ข้อ 6.4)

6.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

นำ PCR products ที่ได้จากข้อ 6.2.5 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PureLink™ Quick PCR purification kit (Invitrogen) และส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ที่ FirstBASE Laboratories SdnBhd (604944-x), Malaysia จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์โดยโปรแกรม FinchTV (version 1.4.0) และ BioEdit (version 7.2.5.0) ก่อนนำไป Blast (www.ncbi.nim.gov/BLAST/) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S ribosomal RNA sequences ใน NCBI และดำเนินการระบุสปีชีส์โดยใช้ % similarity ตั้งแต่ 99% ขึ้นไป

6.4 Agarose gel electrophoresis

6.4.1 เตรียมเจล agarose 1.2 เปอร์เซ็นต์ โดยละลายผง agarose ใน 1X TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้ไมโครเวฟช่วยในการละลาย ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิที่ 55-60 องศาเซลเซียส แล้วปิเปตสารละลาย ethidium bromide (10 mg/ml) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงไปผสมในสารละลาย agarose 100 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของ ethidium bromide เท่ากับ 0.05 มิลลิกรัม)

6.4.2 เทสารละลาย agarose ลงใน gel chamber ที่มี comb วางไว้เพื่อให้เกิด well ปล่อยให้สารละลาย agarose แข็งตัวโดยใช้เวลาอย่างน้อย 30 นาที

6.4.3 นำ gel ที่ดึง comb ออกแล้วมาวางลงใน gel chamber แล้วเติม 1X TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA) ลงทั้ง 2 ข้างของ gel chamber

6.4.4 ผสมดีเอ็นเอหรือ PCR Product ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร กับ loading buffer 1 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน แล้วเติมลงในแต่ละ well ของเจล

6.4.5 ปิเปต 100bp DNA ladder (Invitrogen) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงใน 1 หลุมของเจล

6.4.6 ให้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลาอย่างน้อย 40 นาที

6.4.7 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยนำเจลอะกาโรสไปส่องภายใต้รังสีอัลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพเก็บไว้

7. การทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ

7.1 ความสามารถในการทนกรด (Acid tolerance) (ดัดแปลงจาก Erkkila & Petaja, 2000) มีวิธีการทดสอบดังนี้

7.1.1 streak เชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar แล้วนำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยในการทดลองใช้เชื้อ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง

7.1.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวจากข้อ 7.1.1 มา 3 โคโลนี ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^{8}-10^{9} cfu/ml

7.1.3 เตรียม PBS ในหลอดทดลอง หลอดละ 10 มิลลิลิตร โดยปรับ pH ด้วย 8 M HCl และ 5 N NaOH ให้ได้ pH 2, 3, 4 และ 5 เติม pepsin ในแต่ละหลอดให้ได้ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์

7.1.4 ปิเปตเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมได้จาก BM broth ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด PBS ที่เตรียมไว้ในข้อ 7.1.3

7.1.5 เก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ หลังจากบ่มเป็นเวลา 0, 30 นาที, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง มาวิเคราะห์จำนวนเชื้อแบคทีเรีย โดยปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาเจือจางแบบ 10 เท่า ตามลำดับส่วน (ten-fold dilution) ด้วยสารละลาย anaerobic dilution buffer ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับการเจือจางที่ต้องการ ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar ทำการ spread plate แล้วนำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

7.1.6 นับจำนวนโคโลนีบนอาหาร BM agar แล้วนำไปคำนวณปริมาณแบคทีเรีย (cfu/ml) ที่ค่า pH ต่าง ๆ

7.1.7 วิเคราะห์ผลการทดสอบความสามารถในการทนกรด โดยเปรียบเทียบจำนวนเซลล์เริ่มต้น (0 ชั่วโมง) และจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตที่ช่วงเวลาต่าง ๆ จากนั้นนำข้อมูลมาแทนค่าในสูตรเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (Simpson et al., 2005) ดังต่อไปนี้

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต $= (N/ N_0) \times 100$

เมื่อ N = ปริมาณแบคทีเรียที่รอดชีวิต (cfu/ml)

N_0 = ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น (cfu/ml)

7.2 ความสามารถในการทนน้ำดี (Bile tolerance) (ดัดแปลงจาก Chung et al., 1999)

7.2.1 streak เชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยในการทดลองใช้เชื้อ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง

7.2.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวจากข้อ 7.2.1 มา 3 โคโลนี ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 10^8-10^9 cfu/ml

7.2.3 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BM broth (pH 5) ที่มี oxgall ที่ความเข้มข้น 0, 0.30 และ 1 เปอร์เซ็นต์ หลอดละ 10 มิลลิลิตร

7.2.4 ปิเปตเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมใน BM broth (ข้อ 7.2.2) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด BM broth ที่มี oxgall ความเข้มข้นแตกต่างกัน (ข้อ 7.2.3) แล้ววางไว้เป็นเวลา 0, 30 นาที, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง

7.2.5 เก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ มาวิเคราะห์จำนวนเชื้อแบคทีเรีย โดยปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาเจือจางแบบ 10 เท่า ตามลำดับส่วน (ten-fold dilution) ด้วยสารละลาย anaerobic dilution buffer ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับการเจือจางที่ต้องการ ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar ทำการ spread plate แล้วนำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

7.2.6 นับจำนวนโคโลนีบนอาหาร BM agar แล้วนำไปคำนวณปริมาณแบคทีเรีย (cfu/ml) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของ oxgall

7.2.7 วิเคราะห์ผลการทดสอบความสามารถในการทนน้ำดี โดยเปรียบเทียบจำนวนเซลล์เริ่มต้น (0 ชั่วโมง) และจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตที่ช่วงเวลาต่าง ๆ จากนั้นนำข้อมูลมาแทนค่าในสูตรเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (Simpson et al., 2005) ดังต่อไปนี้

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต $= (N/ N_0) \times 100$

เมื่อ $N =$ ปริมาณแบคทีเรียที่รอดชีวิต (cfu/ml)

$N_0 =$ ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น (cfu/ml)

7.3 ความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ (ดัดแปลงจาก Ehrmann, Kurzak, Bauer, & Vogel, 2002 ; นภาพร เลิศวรปรีชา, 2550)

7.3.1 เตรียม Intestinal mucus โดยใช้ spatula ขูดเอา mucus ปริมาณ 10 กรัม จากลำไส้ของไก่อายุ 45 วัน มาใส่ในสารละลาย phosphate buffer solution (PBS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7.3.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนแยกแบคทีเรียที่ปนเปื้อนออก

7.3.3 นำส่วนใสมาปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง เพื่อทำการตกตะกอน mucus ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที

7.3.4 นำเอาตะกอนที่ได้มาเติม PBS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำไป lyophilized ด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dryer) แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7.3.5 เตรียม mucus solution และเคลือบ mucus solution ใน microcentrifuge tube โดยชั่ง mucus 0.01 กรัม ละลายใน 50 mM Na_2CO_3 buffer (pH 9.7) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงใน microcentrifuge tube ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.3.6 เตรียมเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบและ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 โดย streak เชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ streak เชื้อ *S.* Enteritidis DMST 15676 และ *B. subtilis* ATCC 6633 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA agar) บ่มเพาะเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.3.7 เลือกโคโลนีเดี่ยวจากข้อ 7.3.6 มา 3 โคโลนี โดยแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ และ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 10^8-10^9 cfu/ml ส่วนเชื้อ *S.* Enteritidis DMST 15676 และ *B. subtilis* ATCC 6633 ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเพาะเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 10^8-10^9 cfu/ml

7.3.8 เจือจางเชื้อแบคทีเรียให้ได้ปริมาณเชื้อประมาณ $1.5x10^8$ cfu/ml ปิเปตเชื้อปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ใส่ในแต่ละหลอดที่เตรียมไว้ในข้อ 7.3.5 โดยใช้ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 และ *S.* Enteritidis DMST 15676 เป็น positive control และ *B. subtilis* ATCC 6633 เป็น nagative control นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำ *S.* Enteritidis DMST 15676 และ *B. subtilis* ATCC 6633 ไปบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7.3.9 ล้างเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ยึดเกาะออกด้วย PBS ที่เติม Tween 20 (0.05 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ทั้งหมด 3 ครั้ง โดยการพลิกหลอดไปมาก่อนเท PBS ทิ้ง จากนั้นเก็บเซลล์แบคทีเรียที่ยึดเกาะโดยเติมสารละลาย anaerobic dilution buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในแต่ละหลอด พลิกหลอดไปมา จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมด 1 มิลลิลิตร มาเจือจางแบบ 10 เท่า ตามลำดับส่วน (ten-fold dilution) ด้วยสารละลาย anaerobic dilution buffer ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับการเจือจางที่ต้องการ ปิเปตสารละลายที่เจือจางแล้วตัวอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar ทำการ spread plate นำแบคทีเรียทดสอบไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และนำ *S.* Enteritidis DMST 15676 และ *B. subtilis* ATCC 6633 ไปบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียแล้วนำไปคำนวณปริมาณแบคทีเรีย จากนั้นนำมาแทนค่าในสูตร (นภาพร เลิศวรปรีชา, 2550) ดังต่อไปนี้

ประสิทธิภาพในการยึดเกาะได้ของแบคทีเรีย (เปอร์เซ็นต์) = $(N/ N_0) x100$

เมื่อ N = ปริมาณแบคทีเรียที่ยึดเกาะได้ (cfu/ml)

N_0 = ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น (cfu/ml)

7.4 ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน (ดัดแปลงจาก Maxwell et al., 2004)

7.4.1 streak เชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยในการทดลองใช้เชื้อ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง

7.4.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวจากข้อ 7.4.1 มา 3 โคโลนี ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 10^8-10^9 cfu/ml

7.4.3 ปิเปตเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 6 หลอด

7.4.4 แบ่งหลอด BM broth จำนวน 3 หลอด ไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน และนำ BM broth อีก 3 หลอด ไปบ่มในสภาวะปกติที่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.4.5 ตรวจสอบการเจริญโดยนำเซลล์แขวนลอยไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร คำนวณค่าความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (RBGR = relative bacteria growth ratio) โดย ค่า RBGR คำนวณได้จาก

$$\text{RBGR} = \frac{\text{OD}_{630} \text{ ในสภาวะที่มีออกซิเจน}}{\text{OD}_{630} \text{ ในสภาวะไร้ออกซิเจน}}$$

7.5 ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง (Heat tolerance) (ดัดแปลงจาก Simpson et al., 2005)

7.5.1 streak เชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยในการทดลองใช้เชื้อ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง

7.5.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวจากข้อ 7.5.1 มา 3 โคโลนี ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 10^8-10^9 cfu/ml

7.5.3 ปิเปตเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

7.5.4 นำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42, 52, 55, 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 5, 10, 30 และ 60 นาที

7.5.5 เมื่อครบกำหนดเวลาที่ต้องการทดสอบ ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิต่าง ๆ มาเจือจางแบบ 10 เท่า ตามลำดับส่วน (ten-fold dilution) ด้วยสารละลาย anaerobic dilution buffer ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับการเจือจางที่ต้องการ ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar ทำการ spread plate แล้วนำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่รอดชีวิต

7.5.6 วิเคราะห์ผลการทดสอบความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง โดยเปรียบเทียบจำนวนเซลล์เริ่มต้น (0 ชั่วโมง) และจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตที่ช่วงเวลาต่าง ๆ จากนั้นนำข้อมูลมาแทนค่าในสูตรเพื่อคำนวนหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (Simpson et al., 2005) ดังต่อไปนี้

เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต $= (N/ N_0) \times 100$

เมื่อ N = ปริมาณแบคทีเรียที่รอดชีวิต (cfu/ml)

N_0 = ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น (cfu/ml)

7.6 การศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพ (ดัดแปลงจาก Clinical and Laboratory Standard Institute [CLSI], 2007)

7.6.1 streak เชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยในการทดลองใช้เชื้อ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง

7.6.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวจากข้อ 7.6.1 มา 3 โคโลนี ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 10^8-10^9 cfu/ml

7.6.3 ปิเปตเชื้อ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลาย anaerobic dilution buffer ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของเชื้อประมาณ $1.0 - 1.5 \times 10^8$ cfu/ml

7.6.4 ใช้ไม้พันสำลีปราศจากเชื้อจุ่มเซลล์แขวนลอยจากข้อ 7.6.3 แล้วนำมาป้ายให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton agar (MHA agar)

7.6.5 วางแผ่นดิสก์ยาปฏิชีวนะบนผิวหน้าอาหาร MHA agar โดยวางให้ห่างกันพอสมควร โดยยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้คือ Amoxycillin (10 µg), Erythromycin (15 µg), Gentamicin (10 µg), Neomycin (30 µg), Sulphamethoxazole (25 µg), Fosfomycin (50 µg), Colistin sulphate (10 µg), Lincomycin (2 µg), Enrofloxacin (5 µg), Doxycyclin (30 µg), Lincomycin 109 (109 µg) และ Oxytetracycline (30 µg)

7.6.6 บ่มเพาะเชื้อในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.6.7 วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่นดิสก์ยาปฏิชีวนะและประเมินความไวของแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพโดยเปรียบเทียบกับ Breakpoints ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดตามเกณฑ์ของ CLSI (2007)

7.7 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (Inhibition of pathogen growth) ด้วยวิธี overlay method (ดัดแปลงจาก Teanpaisam, chooruk, Wannun, Wichienchot, & Piwat, 2012)

7.7.1 streak เชื้อแบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง

7.7.2 ใช้ loop แตะเชื้อจากข้อ 7.7.1 มาวนเป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BM agar จานละ 3 จุด แล้วนำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.7.3 นำเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *E. coli* ATCC 25922, *S.* Typhimurium DMST 15674, *S.* Enteritidis DMST 15676, *E. aerogenes* ATCC 13048, *Ps. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S. aureus* ATCC 6538 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาปรับความขุ่นของเชื้อด้วยสารละลาย anaerobic dilution buffer วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 0.25

7.7.4 ปิเปตเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปรับความขุ่นแล้ว (จากข้อ 7.7.3) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI soft agar (7g/L agar) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเททับบนอาหาร BM agar ที่มีเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบเจริญอยู่ (จากข้อ 7.7.2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.7.6 อ่านผลการทดสอบโดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ที่เกิดขึ้น

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การคัดแยกและการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Bifidobacterium* spp.

1.1 การคัดแยกเชื้อ *Bifidobacterium* spp.

1.1.1 ตัวอย่างจากอุจจาระเด็กทารกแรกเกิด-5 เดือน จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยคัดเลือกโคโลนีที่สงสัยที่มีลักษณะโคโลนีสีขาว ขอบเรียบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ≥ 1 มิลลิเมตร (ภาพที่ 4-1) ตัวอย่างละ 10-20 โคโลนี จากนั้นนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมแกรม (Gram's stain) คัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะเซลล์เป็นรูปท่อน แกรมบวก (gram positive) รูปร่างแตกต่างกัน โดยมีทั้งรูปท่อนโค้งและรูปร่างคล้ายกระบอง ไม่สร้างสปอร์ การเรียงตัวมักเรียงตัวเป็นสาย ซ้อนกันในแนวเดียวกันคล้ายรั้ว บางครั้งเซลล์เรียงตัวเป็นรูปตัววี จากลักษณะโคโลนีและลักษณะเซลล์ทำให้สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Bifidobacterium* spp. ได้ตัวอย่างละ 10 ไอโซเลท รวมทั้งหมด 100 ไอโซเลท

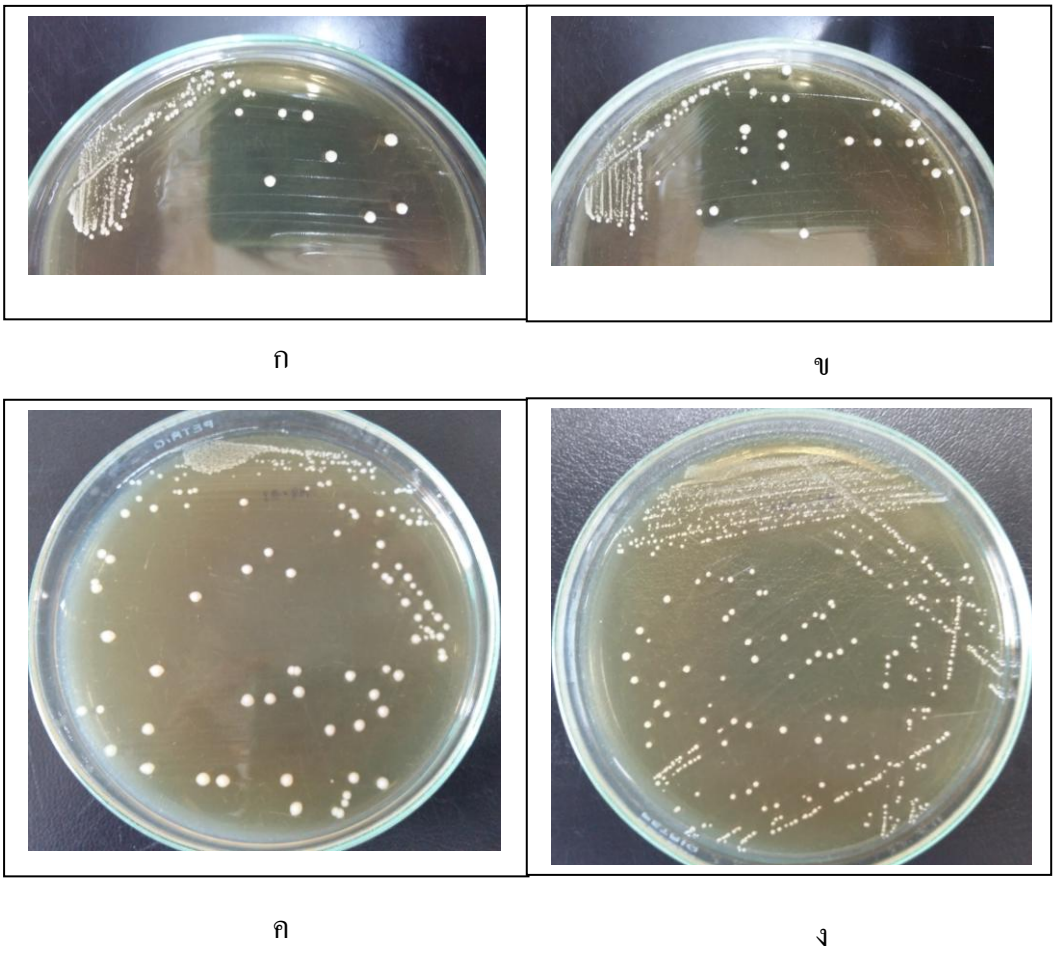
1.1.2 ตัวอย่างจากไก่ จำนวน 10 ตัว โดยเก็บตัวอย่างลำไส้ส่วนต่าง ๆ ทั้งหมด 4 ส่วน สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Bifidobacterium* spp. จากลำไส้เล็กส่วนต้นได้จำนวน 10 ไอโซเลท ลำไส้เล็กส่วนกลางได้จำนวน 13 ไอโซเลท ลำไส้เล็กส่วนปลายได้จำนวน 16 ไอโซเลท และไส้ตันได้จำนวน 41 ไอโซเลท รวมทั้งหมดเป็นจำนวน 80 ไอโซเลท

1.1.3 ตัวอย่างจากสุกร จำนวนตัวอย่างละ 10 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Bifidobacterium* spp. จากมูลลูกสุกรได้มากที่สุดเป็นจำนวน 48 ไอโซเลท รองลงมาคือจากมูลแม่สุกรจำนวน 34 ไอโซเลท และน้ำนมแม่สุกรจำนวน 17 ไอโซเลท รวมทั้งหมดเป็นจำนวน 99 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 จำนวนตัวอย่างที่คัดแยกได้

ตัวอย่าง	แหล่งที่มา / จำนวนที่คัดแยกได้ (ไอโซเลท)							
	เด็กทารก	สุกร			ไก่			
	อุจจาระ	น้ำนม	มูลแม่	มูลลูก	Duodenum	Jejunum	Ileum	Ceacum
	100	17	34	48	10	13	16	41
รวม	100	**99**			**80**			

จากผลการคัดแยกเชื้อข้างต้นสรุปได้ว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่คาดว่าเป็น *Bifidobacterium* spp. จากตัวอย่างอุจจาระเด็กทารก ลำไส้ส่วนต่าง ๆ ของไก่ น้ำนมสุกรและมูลสุกร ได้จำนวนรวมทั้งหมด 279 ไอโซเลท ซึ่งได้ถูกนำไปศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นลำดับต่อไป



ก ข

ค ง

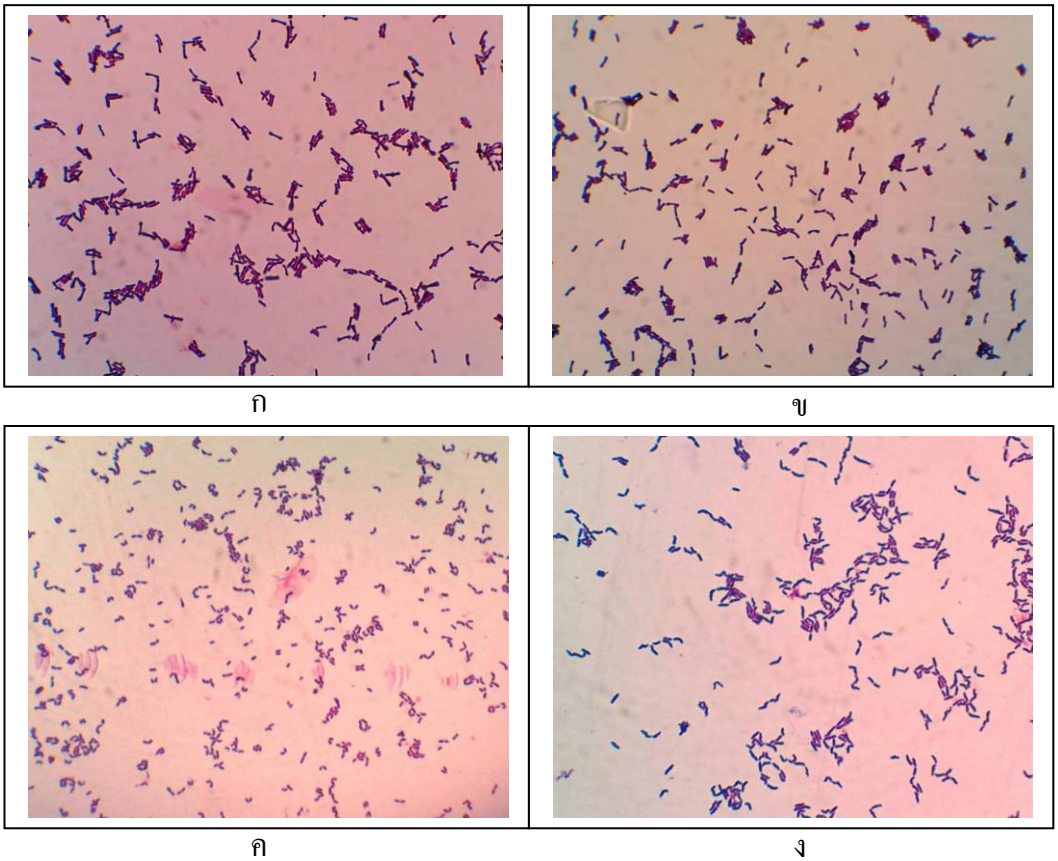
ภาพที่ 4-1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียไอโซเลท C2-C02 (ภาพ ก), C4-C01 (ภาพ ข), H9-01 (ภาพ ค) และ P1-P01 (ภาพ ง) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Bifidobacterium medium (BM agar) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

หมายเหตุ 1. C, H และ P แทนไอโซเลทที่คัดแยกจากไก่ ทารกและสุกร ตามลำดับ

2. หมายเลขชุดแรกแทนลำดับของตัวอย่างและหมายเลขชุดที่สองแทนลำดับของไอโซเลท

1.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

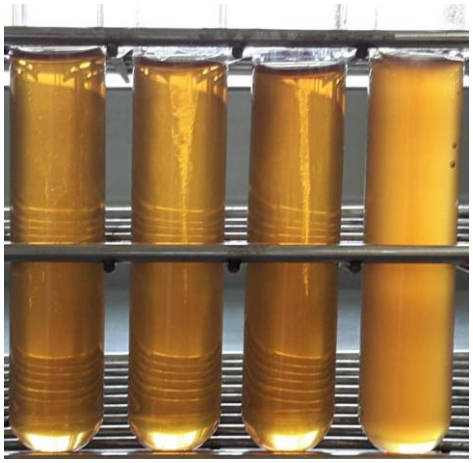
นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จำนวนทั้งหมด 279 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากข้อ 1.1 มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาอีกครั้ง โดยการย้อมแกรมและการย้อมสปอร์ พบว่ามีแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Bifidobacterium* spp. และไม่สร้างสปอร์ จำนวน 164 ไอโซเลท โดยจากการย้อมแกรมแสดงให้เห็นว่าไอโซเลทที่คัดเลือกเป็นเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน โดยบางเซลล์อาจเป็นท่อนโค้งและรูปร่างคล้ายกระบอง การเรียงตัวมักเรียงตัวซ้อนกันในแนวเดียวกันคล้ายรั้ว ซึ่งถูกนำไปศึกษาต่อ ดังแสดงในภาพที่ 4-2 ในขณะที่อีก 115 ไอโซเลท ที่เหลือพบว่าผลจากการย้อมแกรม การย้อมสปอร์ ลักษณะเซลล์และการเรียงตัวของเซลล์ไม่ตรงกับคุณสมบัติของแบคทีเรียสกุล *Bifidobacterium* spp.



ภาพที่ 4-2 ลักษณะเซลล์ที่ผ่านการย้อมแกรม (Gram's stain) ของแบคทีเรียไอโซเลท H9-01 (ภาพ ก), H1-05 (ภาพ ข), P1-P01 (ภาพ ค) และ P9-P01 (ภาพ ง) ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Bifidobacterium medium (BM agar) ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (กำลังขยายรวม 1000 เท่า)

2. การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีและอื่น ๆ

จากการทดสอบ catalase test ของแบคทีเรียจำนวน 164 ไอโซเลท พบว่ามีแบคทีเรียที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบ จำนวน 137 ไอโซเลท (คิดเป็น 83.54 %) การทดสอบ oxidase test พบว่ามีแบคทีเรียที่ให้ผลการทดสอบเป็นลบ จำนวน 154 ไอโซเลท (คิดเป็น 93.90 %) การทดสอบการเคลื่อนที่ พบว่ามีแบคทีเรียที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้จำนวน 128 ไอโซเลท (คิดเป็น 78.05 %) เช่น ไอโซเลท H9-01 ดังแสดงในภาพที่ 4-3 (หลอด ค) และตารางที่ 4-2



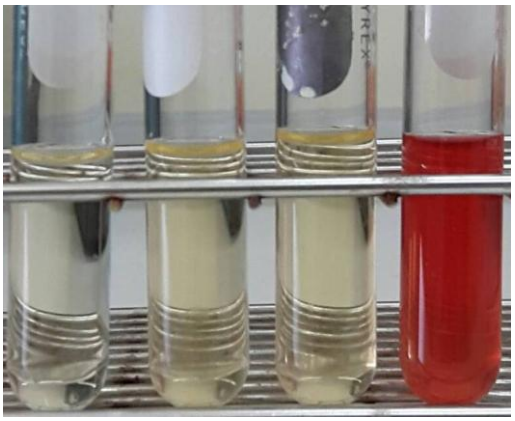
ก ข ค ง

ภาพที่ 4-3 ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย โดยหลอด ก = อาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered Nitrate-Motility medium ปราศจากเชื้อ หลอด ข, ค และ ง คือ อาหาร Buffered Nitrate-Motility medium ที่มี *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527, H9- 01 และ *S.* Enteritidis DMST 15676 ตามลำดับ

ตารางที่ 4-2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและอื่น ๆ ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

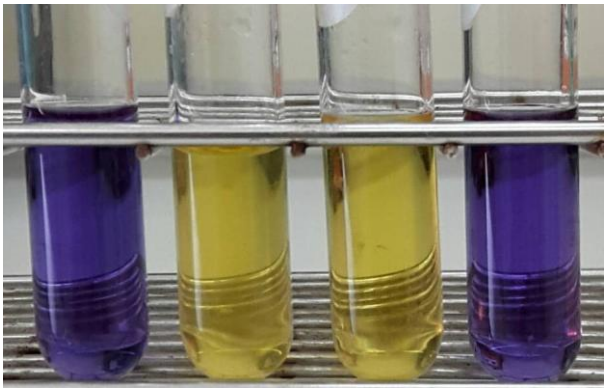
คุณสมบัติทางชีวเคมีและอื่น ๆ	ผลการทดสอบ	% ไอโซเลท
การเคลื่อนที่ (Motility test)	-	78.05
การสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test)	-	83.54
การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test)	-	93.90
การรีดิวซ์ไนเตรต (Nitrate test)	-	75.61
การสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส	+	79.27

จากการทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรต พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้จำนวน 124 ไอโซเลท (คิดเป็น 75.61 %) ดังแสดงในภาพที่ 4-4 (หลอด ค) การทดสอบการสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้จำนวน 130 ไอโซเลท (คิดเป็น 79.27 %) ดังแสดงในภาพที่ 4-5 (หลอด ค) และตารางที่ 4-2



ก ข ค ง

ภาพที่ 4-4 ผลการทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรต โดยหลอด ก = อาหารเลี้ยงเชื้อ Nitrate broth ปราศจากเชื้อ หลอด ข, ค และ ง คืออาหาร Nitrate broth ที่มี *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527, H9- 01 และ *B. subtilis* ATCC 6633 ตามลำดับ



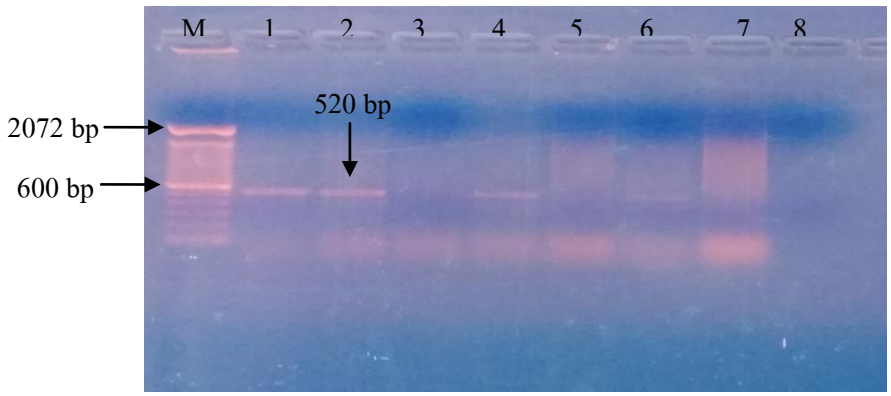
ก ข ค ง

ภาพที่ 4-5 ผลการทดสอบการหมักน้ำตาลกลูโคส โดยหลอด ก = อาหารเลี้ยงเชื้อ BM broth ที่เติมน้ำตาลกลูโคสเพิ่มลงไป 1 % หลอด ข, ค และ ง คืออาหาร BM broth ที่เติมน้ำตาลกลูโคสเพิ่มลงไป 1 % ที่มี *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527, H9-01 และ *S.* Enteritidis DMST 15676 ตามลำดับ

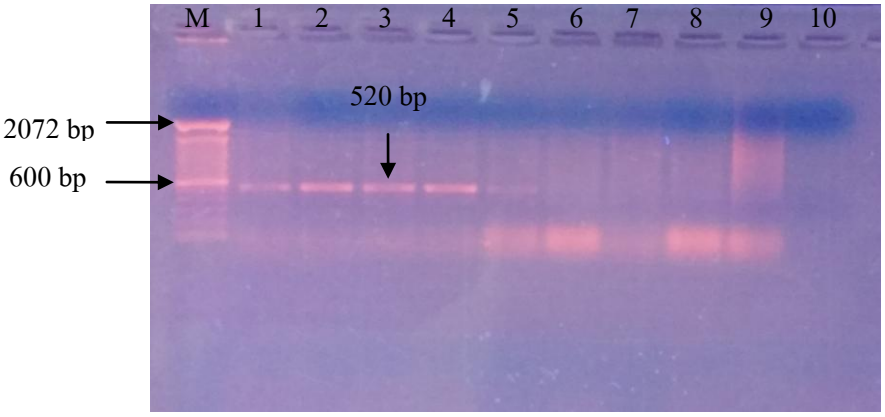
จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียจำนวน 164 ไอโซเลท พบว่ามีแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติด้านต่าง ๆ จำนวนทั้งหมด 98 ไอโซเลท จึงได้นำแบคทีเรียทั้ง 98 ไอโซเลท ไปทดสอบคุณสมบัติในการหมักน้ำตาลแบบ Homofermantative /heterofermentative บนอาหารเลี้ยงเชื้อ lactic bacteria differential agar พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 61 ไอโซเลท ที่มีโคโลนีสีขาว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไอโซเลทดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็น heterofermentative และเมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 61 ไอโซเลท ไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6 PPK) พบว่ามีแบคทีเรียจำนวน 44 ไอโซเลท ที่ให้ผลการทดสอบเป็นบวกโดยเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างไก่ สุกรและอุจจาระเด็กทารก จำนวน 2, 20 และ 22 ไอโซเลท ตามลำดับ จึงนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3. การจัดจำแนก *Bifidobacterium* spp. โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

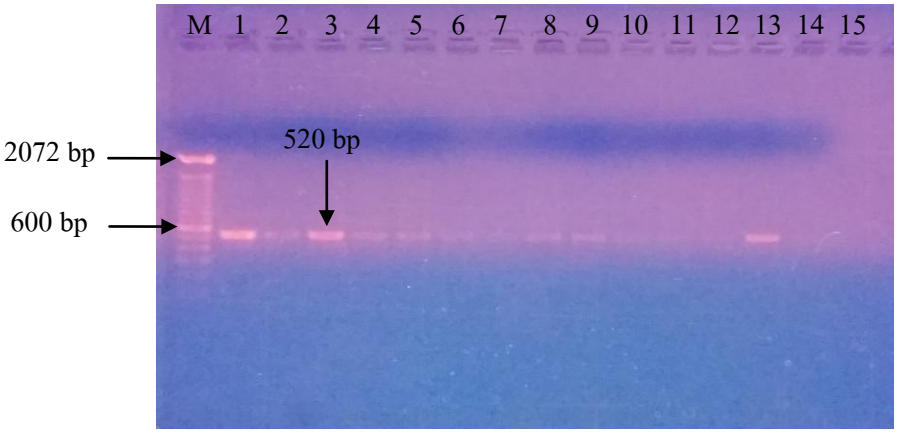
นำดีเอ็นเอที่สกัดจากแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจำนวน 44 ไอโซเลท มาเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ Bif164-f และ Bif662-r (Kok et al., 1996) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน 16S rRNA ของสกุล *Bifidobacterium* spp. พบว่ามี PCR product ขนาดประมาณ 520 คู่เบส จากการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA จากดีเอ็นเอของแบคทีเรียจำนวน 16 ไอโซเลท ซึ่งเป็นตัวอย่างจากสุกรจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ P1-P01, P4-S01, P4-S03, P8-S01, P8-S03 และ P9-P01 และตัวอย่างจากอุจจาระเด็กทารกจำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ H1-05, H9-01, H9-02, H9-03, H9-04, H9-05, H9-06, H10-01, H10-03 และ H10-05 โดยตัวอย่างจากสุกรอีกจำนวน 14 ไอโซเลท ตัวอย่างจากอุจจาระเด็กทารกจำนวน 12 ไอโซเลท และตัวอย่างจากไก่จำนวน 2 ไอโซเลท ตรวจไม่พบ PCR product บนเจลอะกาโรส ดังแสดงในภาพที่ 4-6, 4-7, 4-8 และ 4-9



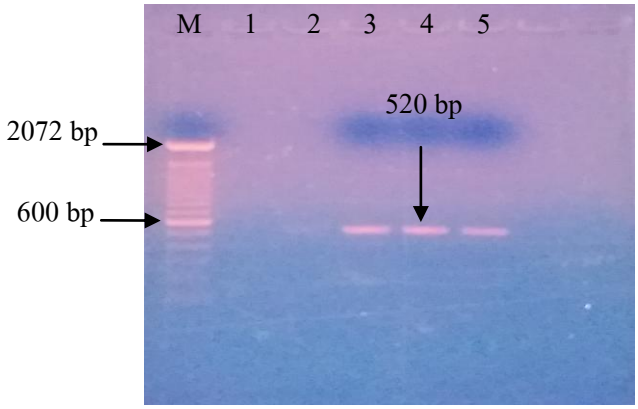
ภาพที่ 4-6 ผลการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Bif164-f และ Bif662-r บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2 % ใน 1x TAE buffer ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที M, (Marker) 100 bp DNA ladder, lane 1 =H10-01, lane 2 = H10-05, lane 3 = P2-P01, lane 4 = P4-S01, lane 5 = P4-S02, lane 6 = P4-S03, lane 7= No template control , lane 8 = No primer control



ภาพที่ 4-7 ผลการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Bif164-f และ Bif662-r บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2 % ใน 1x TAE buffer ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที M, (Marker) 100 bp DNA ladder, lane 1 = *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527, lane 2 = H1-05, lane 3 = H9-01, lane 4 = H9-02, lane 5 = H9-06, lane 6 = H10-02, lane 7 = P6-P03, lane 8 = P7-P01, lane 9= No template control , lane 10 = No primer control



ภาพที่ 4-8 ผลการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Bif164-f และ Bif662-r บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2 % ใน 1x TAE buffer ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที M, (Marker) 100 bp DNA ladder, lane 1 =H9-03, lane 2 = H9-04, lane 3 = H9-05, lane 4 = H9-06, lane 5 = H10-03, lane 6 = P1-P01, lane 7= P7-P01 , lane 8 = P8-S01, lane 9 = P8-S03 , lane 10 = H6-02, lane 11= H7-01 , lane 12 = H10-02, lane 13 = P9-P01, lane 14 = No template control , lane 15= No primer control



ภาพที่ 4-9 ผลการเพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Bif164-f และ Bif662-r บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2 % ใน 1x TAE buffer ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที M, (Marker) 100 bp DNA ladder, lane 1 =C2-C02, lane 2 = C4-C01, lane 3 = P1-P01, lane 4 = P8-S01, lane 5 = P8-S03,

จากการนำ PCR product ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม FinchTV (version 1.4.0) และ BioEdit (version 7.2.5.0) พบว่าชิ้นดีเอ็นเอ contigs ที่วิเคราะห์ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 ชิ้นดีเอ็นเอ contigs ของยีน 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp. จำนวน 16 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ชิ้นดีเอ็นเอ contigs (คู่เบส)	ไอโซเลท	ชิ้นดีเอ็นเอ contigs (คู่เบส)
H1-05	420	H10-03	410
H9-01	438	H10-05	368
H9-02	448	P1-P01	366
H9-03	428	P4-S01	414
H9-04	447	P4-S03	411
H9-05	450	P8-S01	412
H9-06	416	P8-S03	391
H10-01	404	P9-P01	455

เมื่อนำ contigs ที่ได้ (ภาคผนวก ง) ไปวิเคราะห์ nucleotide BLAST บนฐานข้อมูลของ NCBI พบว่าไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระเด็กทารก จำนวน 10 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01, H9-02, H9-03, H9-04, H9-05, H9-06, H10-01, H10-03 และ H10-05 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA คล้ายคลึง 100 เปอร์เซ็นต์ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของ *B. animalis* subsp. *lactis* ในขณะที่ไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างสุกร จำนวน 6 ไอโซเลท พบว่ามี 4 ไอโซเลท คือ P1-P01, P4-S01, P4-S03 และ P8-S03 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA คล้ายคลึง 100 เปอร์เซ็นต์ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของ *B. animalis* subsp. *lactis* ส่วนอีก 2 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากตัวอย่างสุกร คือ P8-S01 และ P9-P01 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA คล้ายคลึง 99 เปอร์เซ็นต์ กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของ *B. animalis* subsp. *lactis* ดังแสดงในตารางที่ 4-4 และตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-4 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากไอโซเลทที่คัดแยกจากตัวอย่างอุจจาระเด็กทารก โดยใช้โปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล NCBI

Isolate	Name	Strain	% Query coverage	% Identity
H1-05	*B. animalis* subsp. *lactis*	AD011	100	100
	B. animalis subsp. *lactis*	YIT 4121	100	100
	B. animalis	JCM 1190	100	99
	B. pseudolongum	PNC-2-9G	100	98
	B. pseudolongum subsp. *globosum*	RU 224	100	98
	B. choerinum	Su 806	100	97
	B. cuniculi	AS 1.2239	100	96
	B. animalis subsp. *animalis*	ATCC 25527	100	95
	B. gallicum	P6	100	95
H9-01	*B. animalis* subsp. *lactis*	AD011	100	100
	B. animalis subsp. *lactis*	YIT 4121	100	100
	B. animalis	JCM 1190	100	99
	B. pseudolongum	PNC-2-9G	100	98
	B. pseudolongum subsp. *globosum*	RU 224	100	98
	B. choerinum	Su 806	100	97
	B. cuniculi	AS 1.2239	100	96
	B. animalis subsp. *animalis*	ATCC 25527	100	95
	B. gallicum	P6	100	95
	B. thermophilum RBL67	RBL67	100	95
	B. thermophilum	AS 1.2235	100	95
	B. thermacidophilum subsp. *porcinum*	P3-14	100	95
H9-02	*B. animalis* subsp. *lactis*	AD011	100	100
	B. animalis subsp. *lactis*	YIT 4121	100	100
	B. animalis	JCM 1190	100	99

ตารางที่ 4-4 (ต่อ)

Isolate	Name	Strain	% Query coverage	% Identity
H9-02	*B. pseudolongum*	PNC-2-9G	100	98
	B. pseudolongum subsp. *globosum*	RU 224	100	98
	B. choerinum	Su 806	100	97
	B. cuniculi	AS 1.2239	100	96
	B. animalis subsp. *animalis*	ATCC 25527	100	95
	B. gallicum	P6	100	95
	B. thermophilum RBL67	RBL67	100	95
	B. thermophilum	AS 1.2235	100	95
	B. thermacidophilum subsp.porcinum	P3-14	100	95
H9-03	*B. animalis* subsp. *lactis*	AD011	100	100
	B. animalis subsp. *lactis*	YIT 4121	100	100
	B. animalis	JCM 1190	99	99
	B. pseudolongum	PNC-2-9G	100	98
	B. pseudolongum subsp. *globosum*	RU 224	99	98
	B. choerinum	Su 806	100	97
	B. cuniculi	AS 1.2239	99	96
	B. animalis subsp. *animalis*	ATCC 25527	100	95
	B. gallicum	P6	99	95
H9-04	*B. animalis* subsp. *lactis*	AD011	100	100
	B. animalis subsp. *lactis*	YIT 4121	100	100
	B. animalis	JCM 1190	100	99
	B. pseudolongum	PNC-2-9G	100	98
	B. pseudolongum subsp. *globosum*	RU 224	100	98
	B. choerinum	Su 806	100	97
	B. cuniculi	AS 1.2239	100	96

ตารางที่ 4-4 (ต่อ)

Isolate	Name	Strain	% Query coverage	% Identity
H9-04	*B. animalis* subsp. *animalis*	ATCC 25 527	100	95
	B. gallicum	P6	100	95
	B. thermophilum RBL67	RBL67	100	95
	B. thermophilum	AS 1.2235	100	95
	B. thermacidophilum subsp.porcinum	P3-14	100	95
H9-05	*B. animalis* subsp. *lactis*	AD011	100	100
	B. animalis subsp. *lactis*	YIT 4121	100	100
	B. animalis	JCM 1190	100	99
	B. pseudolongum	PNC-2-9G	100	98
	B. pseudolongum subsp. *globosum*	RU 224	100	98
	B. choerinum	Su 806	100	97
	B. cuniculi	AS 1.2239	100	96
	B. animalis subsp. *animalis*	ATCC 25527	100	95
	B. gallicum	P6	100	95
	B. thermophilum RBL67	RBL67	100	95
	B. thermophilum	AS 1.2235	100	95
	B. thermacidophilum subsp.porcinum	P3-14	100	95
H9-06	*B. animalis* subsp. *lactis*	AD011	100	100
	B. animalis subsp. *lactis*	YIT 4121	100	100
	B. animalis	JCM 1190	100	99
	B. pseudolongum	PNC-2-9G	100	98
	B. pseudolongum subsp. *globosum*	RU 224	100	98
	B. choerinum	Su 806	100	97
	B. cuniculi	AS 1.2239	100	96
	B. animalis subsp. *animalis*	ATCC 25527	100	95

ตารางที่ 4-4 (ต่อ)

Isolate	Name	Strain	% Query coverage	% Identity
H9-06	*B. gallicum*	P6	100	95
H10-01	*B. animalis* subsp. *lactis*	AD011	96	100
	B. animalis subsp. *lactis*	YIT 4121	96	100
	B. animalis	JCM 1190	96	99
	B. pseudolongum	PNC-2-9G	96	98
	B. pseudolongum subsp. *globosum*	RU 224	96	98
	B. choerinum	Su 806	96	97
	B. cuniculi	AS 1.2239	96	96
	B. animalis subsp. *animalis*	ATCC 25527	96	95
	B. gallicum	P6	96	95
H10-03	*B. animalis* subsp. *lactis*	AD011	100	100
	B. animalis subsp. *lactis*	YIT 4121	100	100
	B. animalis	JCM 1190	100	99
	B. pseudolongum	PNC-2-9G	100	98
	B. pseudolongum subsp. *globosum*	RU 224	100	98
	B. choerinum	Su 806	100	97
	B. cuniculi	AS 1.2239	100	96
	B. animalis subsp. *animalis*	ATCC 25527	100	95
	B. gallicum	P6	100	95
H10-05	*B. animalis* subsp. *lactis*	AD011	100	100
	B. animalis subsp. *lactis*	YIT 4121	100	100
	B. animalis	JCM 1190	100	99
	B. pseudolongum	PNC-2-9G	100	98
	B. pseudolongum subsp. *globosum*	RU 224	100	98
	B. choerinum	Su 806	100	97
	B. cuniculi	AS 1.2239	100	96

ตารางที่ 4-4 (ต่อ)

Isolate	Name	Strain	% Query coverage	% Identity
H10-05	*B. animalis* subsp. *animalis*	ATCC 25527	99	95
	B. gallicum	P6	100	95

ตารางที่ 4-5 ผลการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากไอโซเลทที่คัดแยกจากตัวอย่างสุกร โดยใช้โปรแกรม BLAST บนฐานข้อมูล NCBI

Isolate	Name	Strain	% Query coverage	% Identity
P1-P01	*B. animalis* subsp. *lactis*	AD011	100	100
	B. animalis subsp. *lactis*	YIT 4121	100	100
	B. animalis	JCM 1190	100	99
	B. pseudolongum	PNC-2-9G	100	99
	B. pseudolongum subsp. *globosum*	RU 224	100	99
	B. choerinum	Su 806	100	97
	B. cuniculi	AS 1.2239	100	95
P4-S01	*B. animalis* subsp. *lactis*	AD011	100	100
	B. animalis subsp. *lactis*	YIT 4121	100	100
	B. animalis	JCM 1190	100	99
	B. pseudolongum	PNC-2-9G	99	99
	B. pseudolongum subsp. *globosum*	RU 224	99	99
	B. choerinum	Su 806	99	97
	B. cuniculi	AS 1.2239	100	96
	B. animalis subsp. *animalis*	ATCC 25527	100	95
	B. gallicum	P6	100	95
	B. thermophilum RBL67	RBL67	99	95
	B. thermophilum	AS 1.2235	99	95

ตารางที่ 4-5 (ต่อ)

Isolate	Name	Strain	% Query coverage	% Identity
P4-S01	*B. thermacidophilum subsp.porcinum*	P3-14	99	95
P4-S03	*B. animalis* subsp. *lactis*	AD011	100	100
	B. animalis subsp. *lactis*	YIT 4121	100	100
	B. animalis	JCM 1190	100	99
	B. pseudolongum	PNC-2-9G	100	98
	B. pseudolongum subsp. *globosum*	RU 224	100	98
	B. choerinum	Su 806	100	97
	B. cuniculi	AS 1.2239	100	96
	B. animalis subsp. *animalis*	ATCC 25527	100	95
	B. gallicum	P6	100	95
P8-S01	*B. animalis* subsp. *lactis*	AD011	100	99
	B. animalis subsp. *lactis*	YIT 4121	100	99
	B. animalis	JCM 1190	100	99
	B. pseudolongum	PNC-2-9G	100	97
	B. pseudolongum subsp. *globosum*	RU 224	100	97
	B. choerinum	Su 806	100	96
	B. cuniculi	AS 1.2239	100	95
P8-S03	*B. animalis* subsp. *lactis*	AD011	100	100
	B. animalis subsp. *lactis*	YIT 4121	100	100
	B. animalis	JCM 1190	100	99
	B. pseudolongum	PNC-2-9G	100	98
	B. pseudolongum subsp. *globosum*	RU 224	100	98
	B. choerinum	Su 806	100	98
	B. cuniculi	AS 1.2239	100	96
	B. animalis subsp. *animalis*	ATCC 25527	100	95
	B. gallicum	P6	100	95

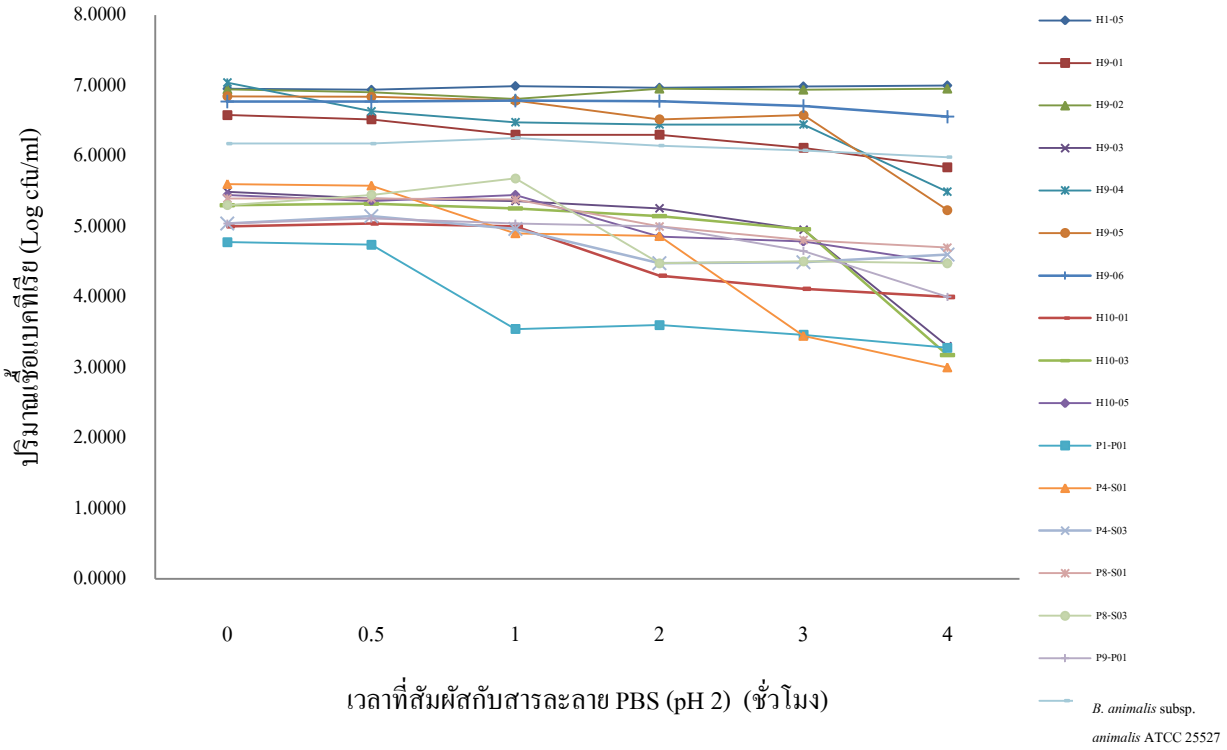
ตารางที่ 4-5 (ต่อ)

Isolate	Name	Strain	% Query coverage	% Identity
P9-P01	*B. animalis* subsp. *lactis*	AD011	100	99
	B. animalis subsp. *lactis*	YIT 4121	100	99
	B. animalis	JCM 1190	100	99
	B. choerinum	Su 806	100	97
	B. pseudolongum	PNC-2-9G	100	96
	B. pseudolongum subsp. *globosum*	RU 224	100	96
	B. gallicum	P6	100	95

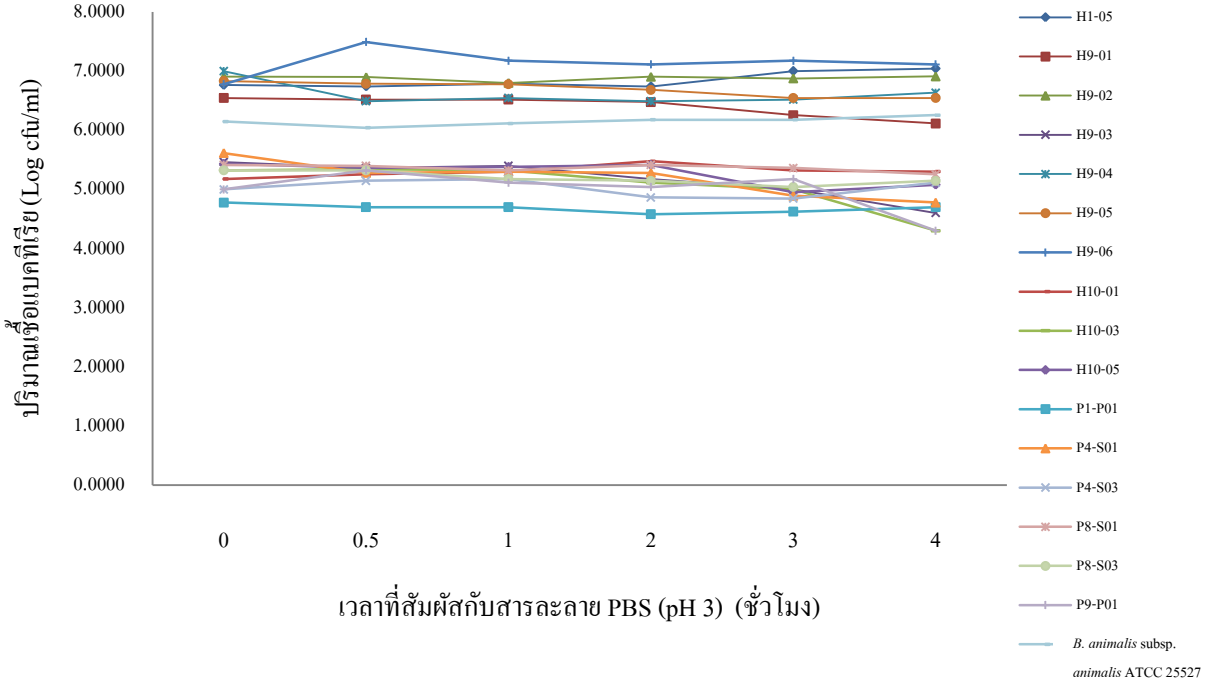
4. การศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ

4.1 การทดสอบความสามารถในการทนกรด (Acid tolerance)

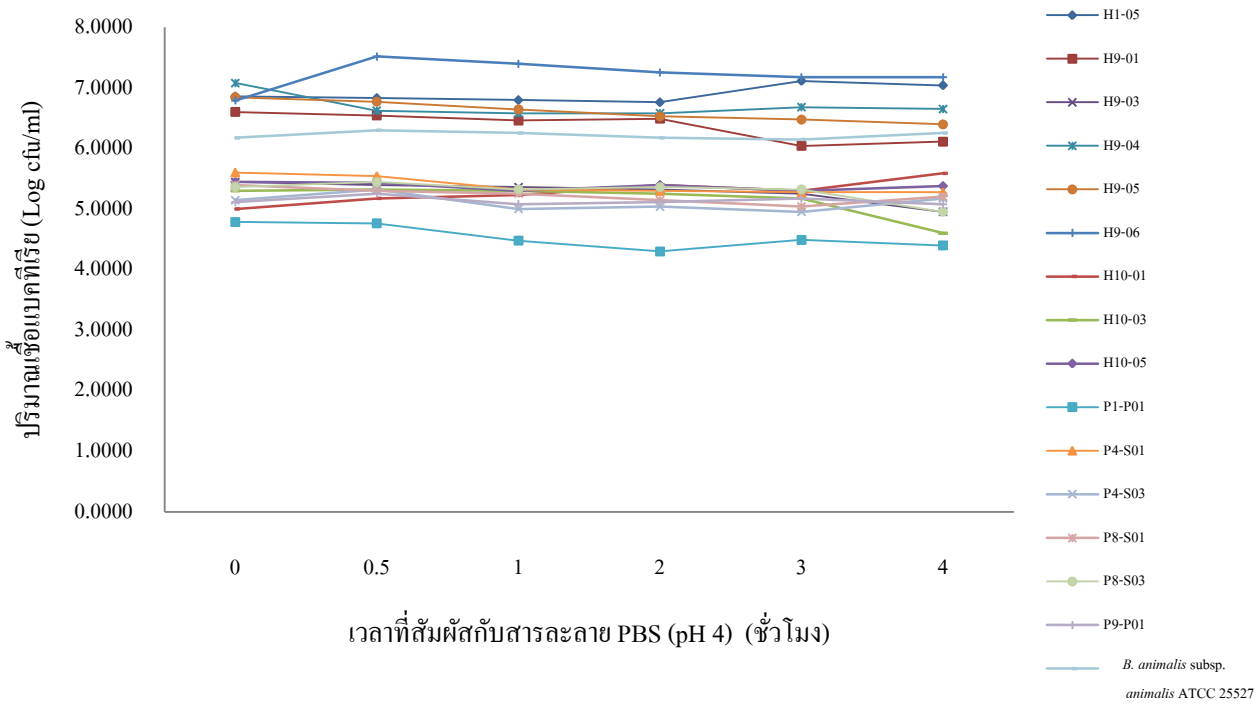
การทดสอบความสามารถในการอยู่รอดของ *B. animalis* subsp. *lactis* ในระบบทางเดินอาหาร โดยการทดสอบความสามารถในการทนกรด จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ที่แยกได้จากเด็กทารกและสุกรจำนวน 6 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01, H9-02, H9-06, P4-S03 และ P8-S01 สามารถทนกรดในสภาวะ pH 2 ที่มี 0.3 เปอร์เซ็นต์ pepsin ได้นานสูงสุดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตเท่ากับ 7.000, 5.8388, 6.9542, 6.5563, 4.6021 และ 4.6990 cfu/ml ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้น ดังแสดงภาพที่ 4-10 และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตกับสายพันธุ์อ้างอิง *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 96.86 % พบว่าเกือบทุกไอโซเลทมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในสภาวะที่มี pH 2 ต่ำกว่า (ตั้งแต่ 53.55 ถึง 96.83 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่มีเชื้อจำนวน 2 ไอโซเลท คือ H1-05 และ H9-02 ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่า *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 คือ 100.66 และ 100.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในสภาวะอื่น ๆ ที่ pH 3, 4 และ 5 พบว่าทุกไอโซเลทสามารถทนกรดที่ pH ดังกล่าวได้นานสูงสุดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4-11, 4-12, 4-13 และ 4-14 ตามลำดับ



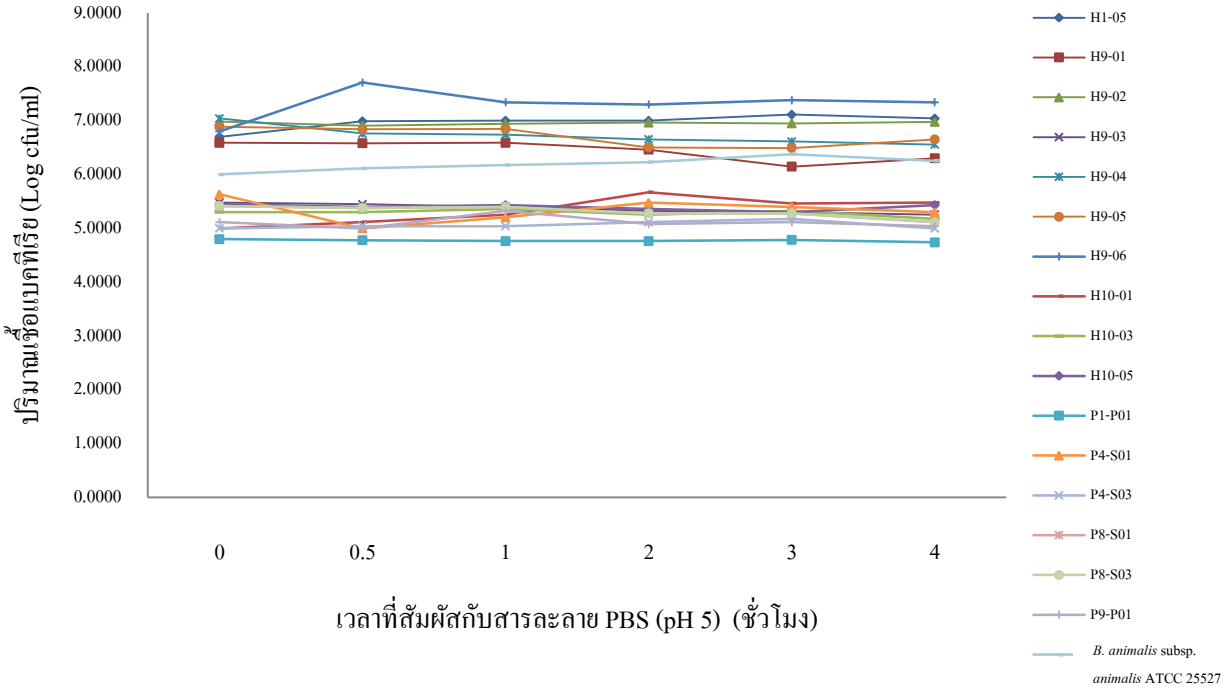
ภาพที่ 4-10 ความสามารถในการทนกรดที่ pH 2 ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก



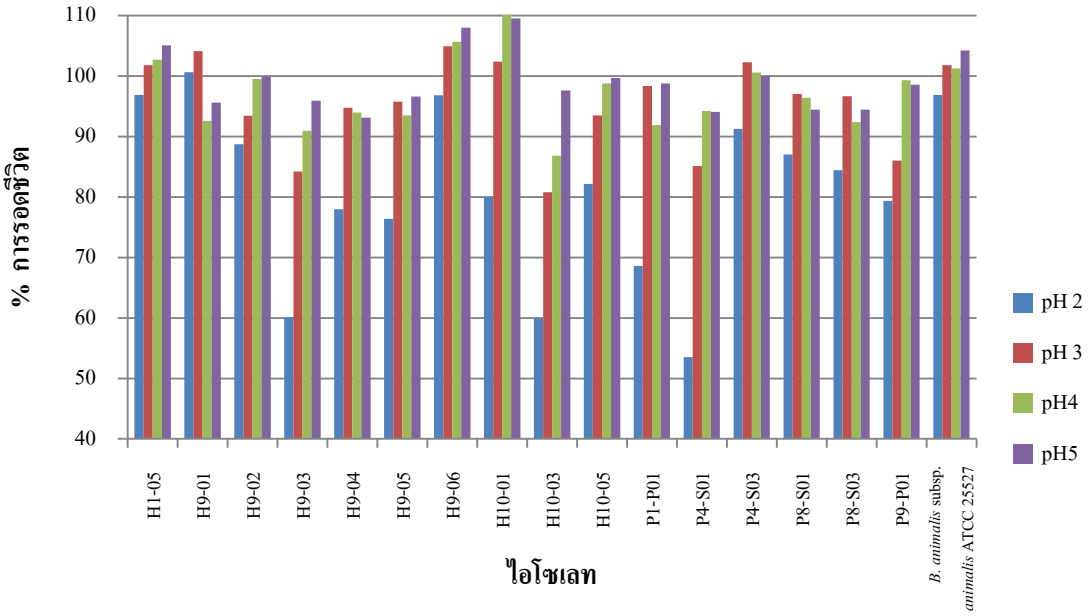
ภาพที่ 4-11 ความสามารถในการทนกรดที่ pH 3 ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก



ภาพที่ 4-12 ความสามารถในการทนกรดที่ pH 4 ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก



ภาพที่ 4-13 ความสามารถในการทนกรดที่ pH 5 ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก



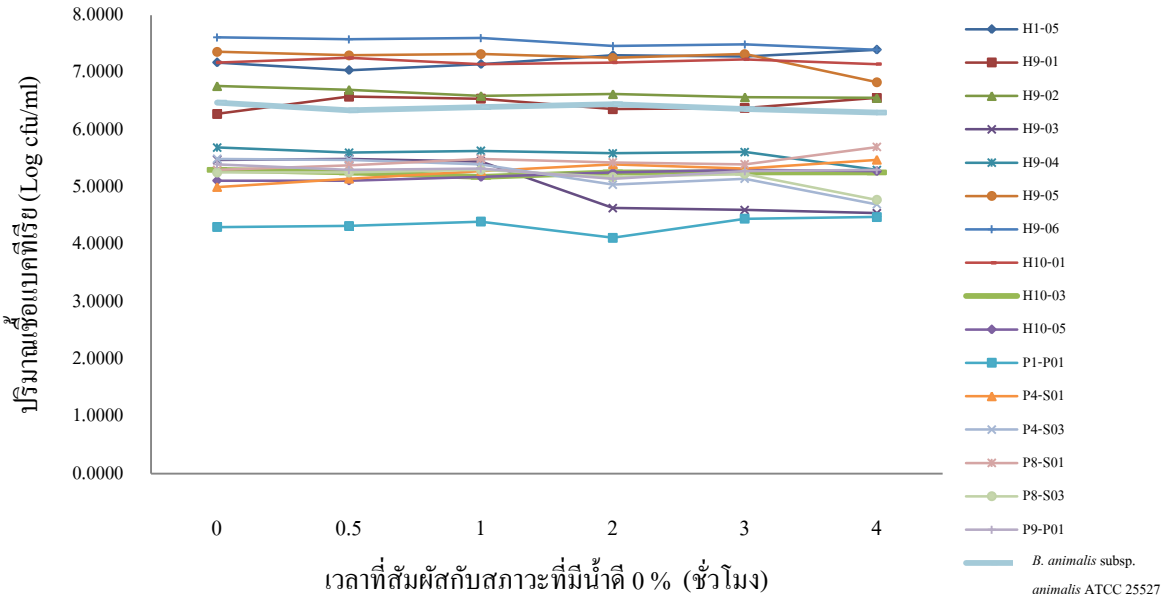
ภาพที่ 4-14 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ pH ต่าง ๆ ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

4.2 ความสามารถในการทนน้ำดี (Bile tolerance)

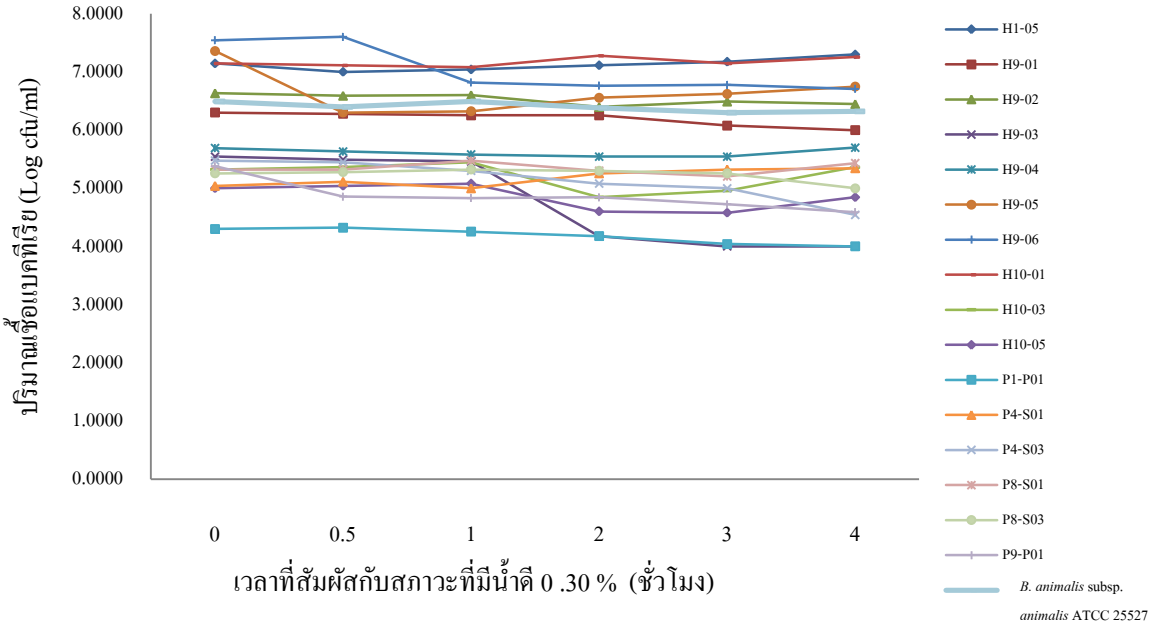
การทดสอบความสามารถในการอยู่รอดของ *B. animalis* subsp. *lactis* ในระบบทางเดินอาหาร โดยการทดสอบความสามารถในการทนน้ำดีทำได้โดยนำเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* จำนวน 16 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01, H9-02, H9-03, H9-04, H9-05, H9-06, H10-01, H10-03, H10-05, P1-P01, P4-S01, P4-S03, P8-S01, P8-S03 และ P9-P01

จากผลการทดสอบพบว่าเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* ที่แยกได้จากเด็กทารกและสุกรจำนวน 10 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01, H9-02, H9-04, H9-05, H9-06, H10-01, P4-S01, P8-S01 และ P8-S03 สามารถทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ได้นานสูงสุดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ (มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต 6.2788, 6.0000, 6.3979, 5.6435, 6.4771, 6.5911, 6.7782, 5.2553, 5.2553 และ 4.9031 log cfu/ml ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้น ดังแสดงในภาพที่ 4-17 และภาพที่ 4-18 และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตกับ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 97.39 % พบว่าเกือบทุกไอโซเลทมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำกว่า (ตั้งแต่ 97.24 ถึง 44.56 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่มีเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลท คือ H9-04, P4-S01 และ P8-S01 ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่า *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 คือ 99.88, 105.11 และ 98.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4-19 ส่วนในสภาวะที่มีความเข้มข้นน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์

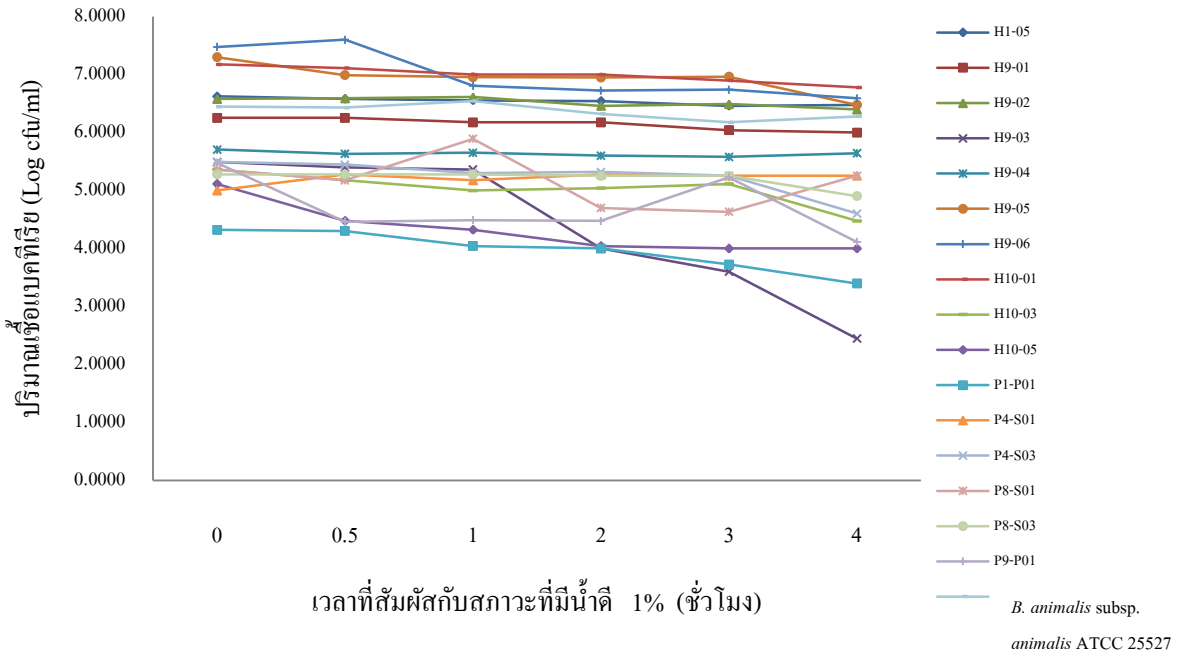
และไม่เติมน้ำดี พบว่าทุกไอโซเลทมีอัตราการรอดชีวิตดีกว่าที่ความเข้มข้นน้ำดี 1 เปอร์เซ็นต์ และสามารถทนได้นานสูงสุด 4 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4-15 และ 4-16



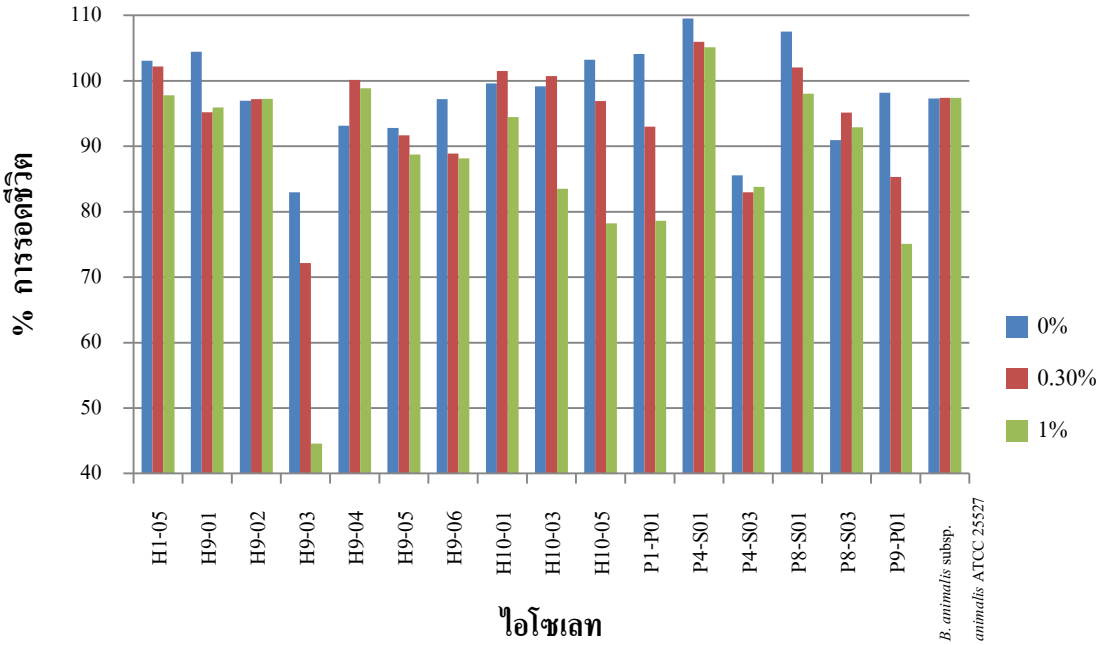
ภาพที่ 4-15 ความสามารถในการทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 0 % ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก



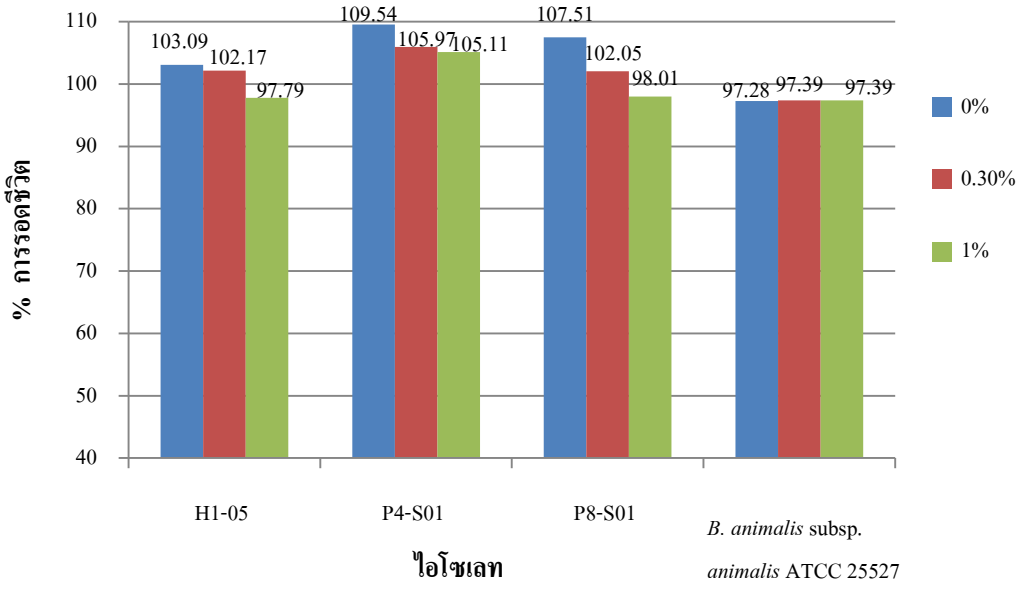
ภาพที่ 4-16 ความสามารถในการทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.30 % ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก



ภาพที่ 4-17 ความสามารถในการทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 1 % ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก



ภาพที่ 4-18 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในการทนน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก



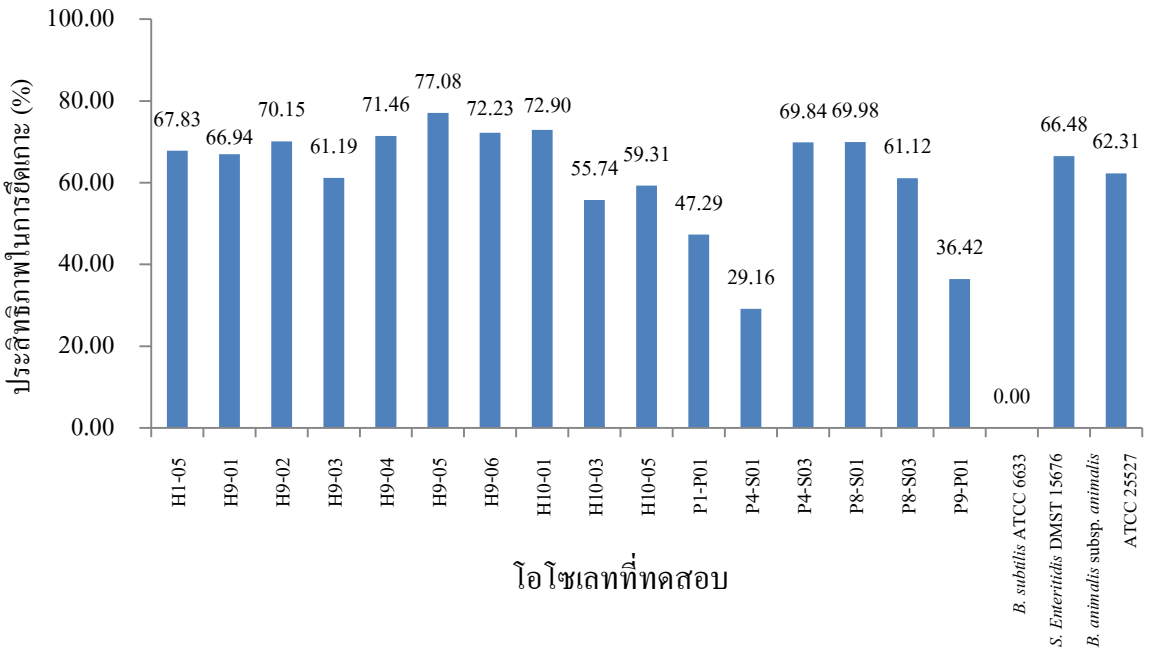
ภาพที่ 4-19 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตในสภาวะที่มีน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ *B. animalis* subsp. *lactis* ไอโซเลท H1-05, P4-S01, P8-S01 และ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527

4.3 ความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อเมือกผนังลำไส้

การทดสอบประสิทธิภาพในการยึดเกาะกับเยื่อเมือกผนังลำไส้ ทำได้โดยนำเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* จำนวน 16 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01, H9-02, H9-03, H9-04, H9-05, H9-06, H10-01, H10-03, H10-05, P1-P01, P4-S01, P4-S03, P8-S01, P8-S03 และ P9-P01 โดยในการทดลองนี้ได้ใช้ *S.* Enteritidis DMST 15676 และ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 เป็น positive control และใช้เชื้อ *B. subtilis* ATCC 6633 เป็น nagative control เนื่องจากมีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่า *S.* Enteritidis มีความสามารถในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ได้ดี ส่วน *B. subtilis* ไม่มีคุณสมบัติในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ (นภาพร เลิศวรปรีชา, 2550) แล้วนำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเซลล์แบคทีเรียที่ไม่ยึดเกาะออกไปและนับจำนวนแบคทีเรียที่ยึดเกาะเพื่อประเมินประสิทธิภาพในการ ยึดเกาะของแบคทีเรีย

จากผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่ใช้เป็น control มีความสามารถในการยึดเกาะหรือไม่ยึดเกาะตามที่คาดหวังไว้โดย *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะ 62.31 เปอร์เซ็นต์ *S.* Enteritidis DMST 15676 มีประสิทธิภาพ

ในการยึดเกาะ 66.48 เปอร์เซ็นต์ และ *B. subtilis* ATCC 6633 ไม่มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ ส่วนเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* ที่แยกได้จากเด็กทารก จำนวน 10 ไอโซเลท พบว่ามี 8 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01, H9-02, H9-03, H9-04, H9-05, H9-06 และ H10-01 ที่มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ได้ในระดับสูง (ประสิทธิภาพการยึดเกาะมากกว่า 60 % โดยใช้เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของ *S.* Enteritidis DMST 15676 และ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 เป็นเกณฑ์) ส่วนอีก 2 ไอโซเลท คือ H10-03 และ H10-05 มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะในระดับปานกลาง (ประสิทธิภาพการยึดเกาะมากกว่า 40% แต่น้อยกว่า 60%) ส่วนไอโซเลทที่แยกได้จากสุกร พบว่าไอโซเลท P4-S03, P8-S01 และ P8-S03 มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะในระดับสูง ไอโซเลท P1-P01 มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะในระดับปานกลาง และไอโซเลท P4-S01 และ P9-P01 มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะในระดับต่ำ (น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์) ดังแสดงในภาพที่ 4-20

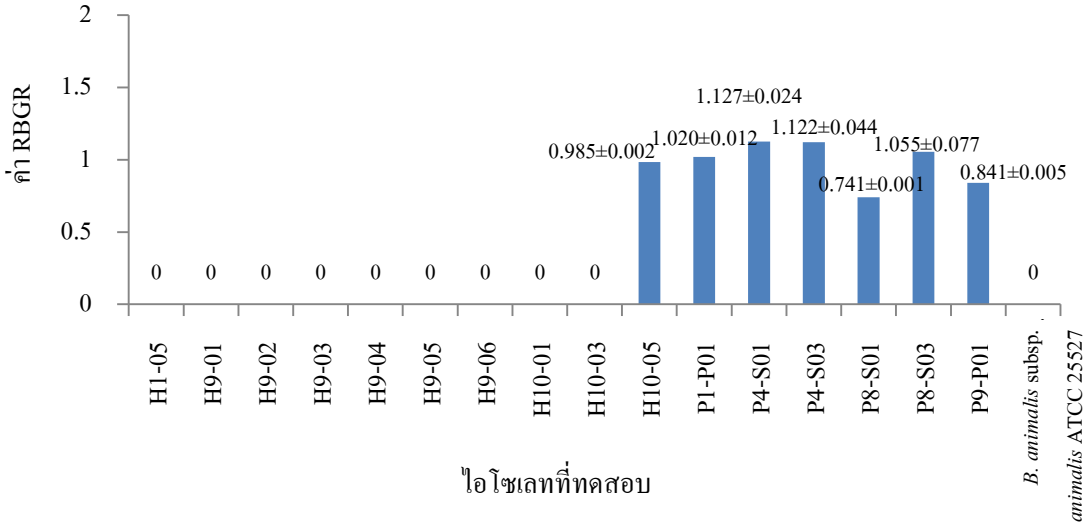


ภาพที่ 4-20 ประสิทธิภาพในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

4.4 ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน

การทดสอบความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ทำได้โดยนำเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* จำนวน 16 ไอโซเลท จากผลการทดสอบพบว่า *B. animalis* subsp. *lactis*

ไอโซเลทที่แยกได้จากอุจจาระเด็กทารก มีเพียง 1 ไอโซเลท คือ H10-05 ที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน (RBGR > 0.9) ในขณะที่อีก 9 ไอโซเลท ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน (RBGR = 0) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิง ส่วนไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรพบว่าทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน โดยมีจำนวน 4 ไอโซเลท คือ P1-P01, P4-S01, P4-S03 และ P8-S03 ที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน ส่วนอีก 2 ไอโซเลท คือ P8-S01 และ P9-P01 สามารถเจริญได้ดีปานกลางในสภาวะที่มีออกซิเจน (RBGR = 0.5-0.9) ดังแสดงในภาพที่ 4-21



ภาพที่ 4-21 ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

4.5 ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง (Heat tolerance)

การทดสอบความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง ทำได้โดยนำเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* จำนวน 16 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01, H9-02, H9-03, H9-04, H9-05, H9-06, H10-01, H10-03, H10-05, P1-P01, P4-S01, P4-S03, P8-S01, P8-S03 และ P9-P01 มาเลี้ยงและเตรียมให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10^8-10^9 cfu/ml แล้วย้ายใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM broth และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42, 52, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 5, 10, 30, และ 60 นาที ตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตและคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต โดยมี *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง

จากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มี *B. animalis* subsp. *lactis* จำนวน 8 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01, H9-02, H9-04, P4-S01, P4-S03, P8-S01 และ P8-S03 ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาแตกต่างกัน โดยในจำนวนนี้ไม่มีไอโซเลทใดสามารถทนได้นาน 60 นาที มีเพียงไอโซเลท P8-S01 ที่สามารถทนได้นานสูงสุดเป็นเวลา 30 นาที ไอโซเลท H9-04 และ P4-S01 สามารถทนได้นานสูงสุด 10 นาที และมีจำนวน 5 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01, H9-02, P4-S03 และ P8-S03 ที่สามารถทนได้นานสูงสุด 5 นาที ในขณะที่ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิงไม่สามารถทนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสได้ ดังนั้น *B. animalis* subsp. *lactis* ทั้ง 8 ไอโซเลท ดังกล่าวจึงจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงในระดับสูง ดังแสดงในตารางที่ 4-6 และภาพที่ 4-25

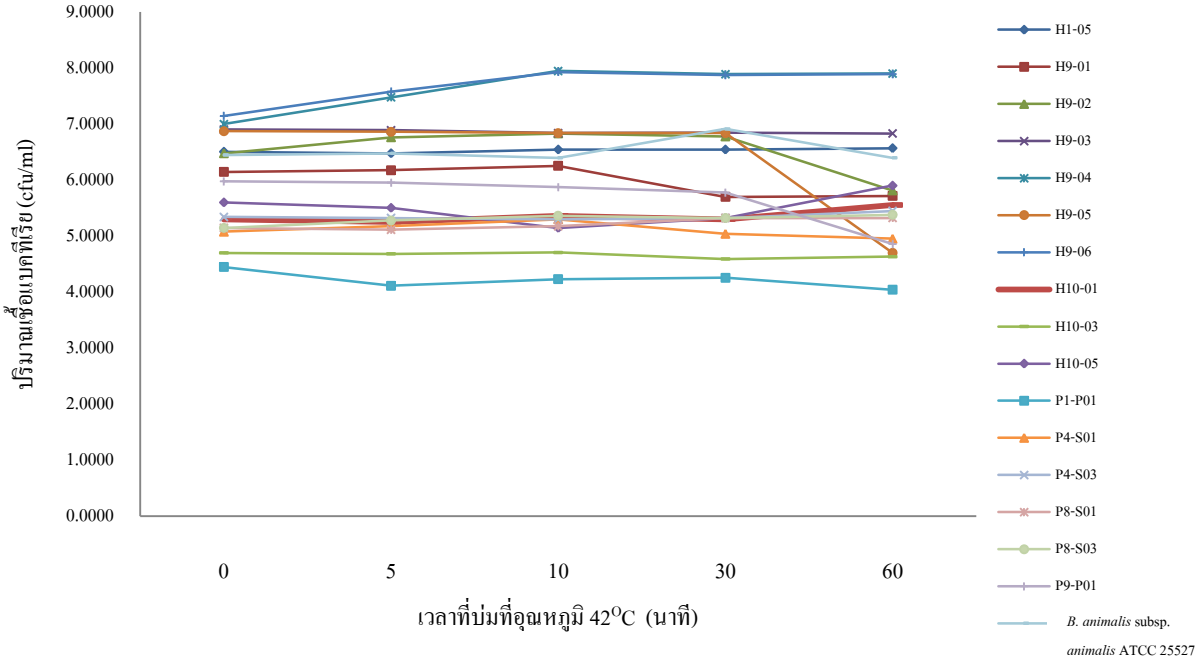
ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่ามี *B. animalis* subsp. *lactis* จำนวน 6 ไอโซเลท คือ H9-03, H9-05, H9-06, H10-01, H10-03 และ H10-05 ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาแตกต่างกัน โดยไอโซเลท H10-01 สามารถทนได้นานสูงสุด 60 นาที มี 4 ไอโซเลท คือ H9-05, H9-06, H10-03 และ H10-05 สามารถทนได้นานสูงสุด 10 นาที ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิง และไอโซเลท H9-03 สามารถทนได้นานสูงสุด 5 นาที ดังนั้น *B. animalis* subsp. *lactis* ทั้ง 6 ไอโซเลท และสายพันธุ์อ้างอิงดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงในระดับปานกลาง ดังแสดงในตารางที่ 4-6 และภาพที่ 4-24

นอกจากนี้ยังพบว่าไอโซเลท P1-P01 และ P9-P01 ทนอุณหภูมิสูงได้ไม่ดีเท่ากับไอโซเลทอื่น ๆ โดยไอโซเลท P1-P01 ทนอุณหภูมิสูงสุดได้ที่ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และไอโซเลท P9-P01 ทนอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงในระดับต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 4-6, ภาพที่ 4-22 และ 4-23

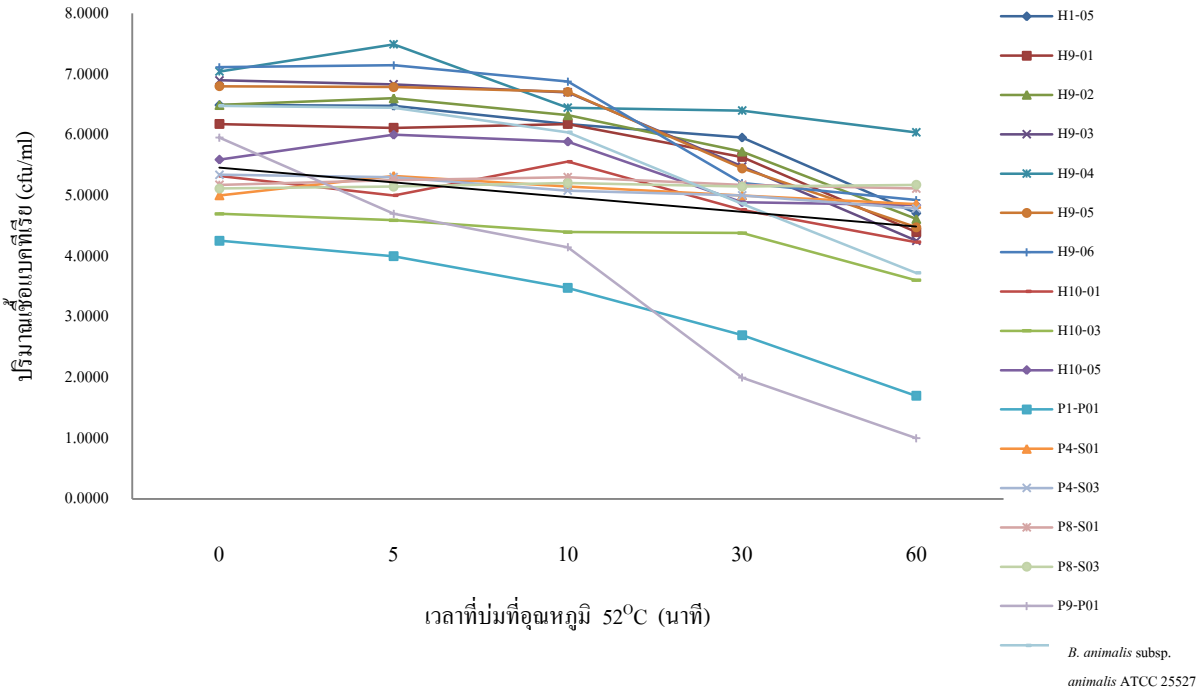
ตารางที่ 4-6 ระยะเวลาในการทนอุณหภูมิสูงของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลท ที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

ลำดับที่	สายพันธุ์	ระยะเวลา (นาที) ที่เชื้อสามารถรอดชีวิตได้ ≥ 85 % ที่อุณหภูมิ				ระดับความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง
		42 ^{O}C	52 ^{O}C	55 ^{O}C	60 ^{O}C	
1	H1-05	60	30	10	5	สูง
2	H9-01	60	30	5	5	สูง
3	H9-02	60	30	10	5	สูง
4	H9-03	60	10	5	-	กลาง
5	H9-04	60	60	10	10	สูง
6	H9-05	30	10	10	-	ปานกลาง
7	H9-06	60	10	10	-	ปานกลาง
8	H10-01	60	30	60	-	ปานกลาง
9	H10-03	60	30	10	-	ปานกลาง
10	H10-05	60	30	10	-	ปานกลาง
11	P1-P01	60	5	-	-	ต่ำ
12	P4-S01	60	60	10	10	สูง
13	P4-S03	60	60	5	5	สูง
14	P8-S01	60	60	30	30	สูง
15	P8-S03	60	60	5	5	สูง
16	P9-P01	30	-	-	-	ต่ำ
17	*B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527	60	10	10	-	ปานกลาง

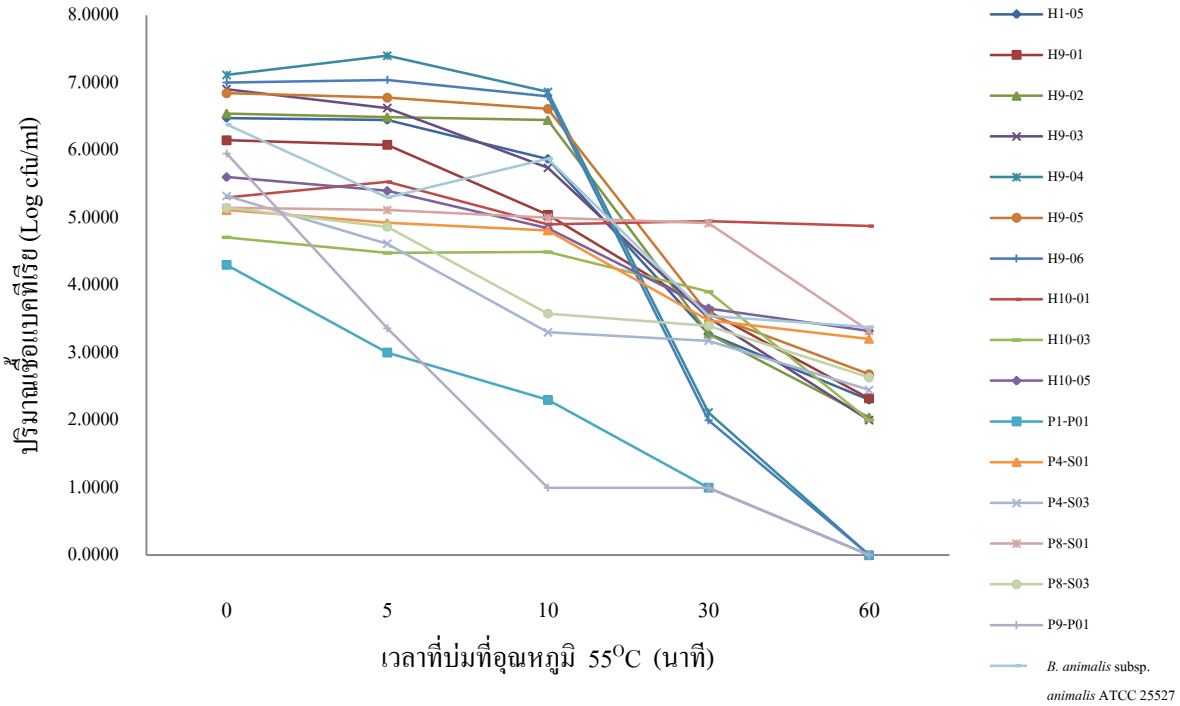
หมายเหตุ 1. ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง (เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์
ระดับสูง เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ที่ 60 ^{O}C
ระดับปานกลาง เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ที่ 55 ^{O}C
ระดับต่ำ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ที่ 52 ^{O}C
2. - หมายถึง เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยกว่า 85 เปอร์เซ็นต์



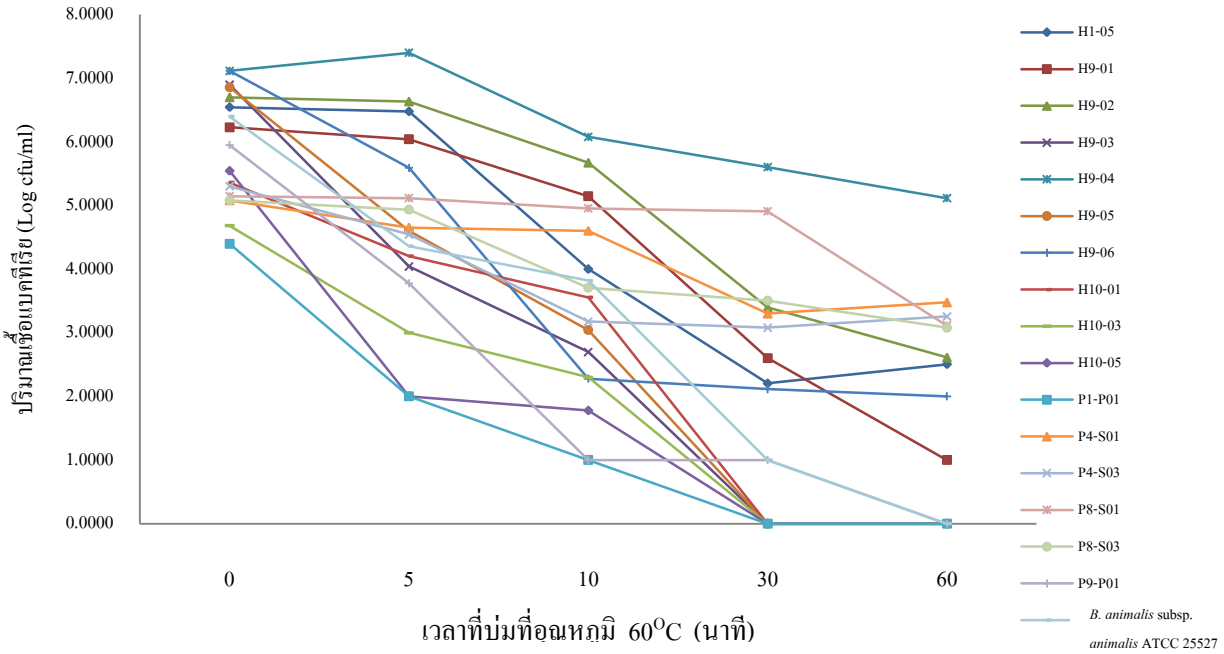
ภาพที่ 4-22 ความสามารถในการทนอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส ของ *B. animalis* subsp. *lactis* ไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก



ภาพที่ 4-23 ความสามารถในการทนอุณหภูมิที่ 52 องศาเซลเซียส ของ *B. animalis* subsp. *lactis* ไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก



ภาพที่ 4-24 ความสามารถในการทนอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส ของ *B. animalis* subsp. *lactis* ไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

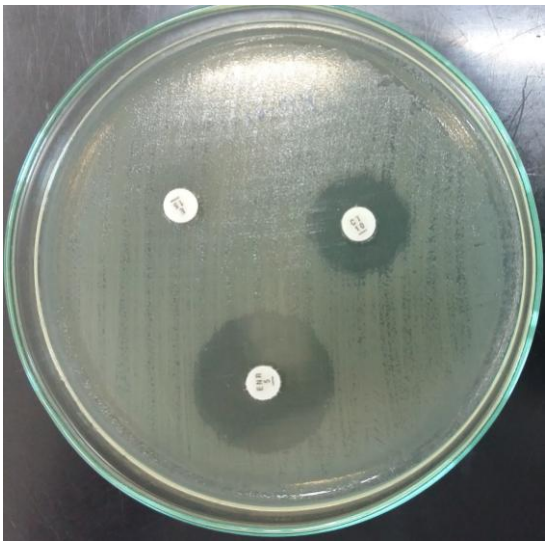


ภาพที่ 4-25 ความสามารถในการทนอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส ของ *B. animalis* subsp. *lactis* ไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

4.6 การศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพ

จากการศึกษาความไวของ *B. animalis* subsp. *lactis* จำนวน 16 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01, H9-02, H9-03, H9-04, H9-05, H9-06, H10-01, H10-03, H10-05, P1-P01, P4-S01, P4-S03, P8-S01, P8-S03 และ P9-P01 ต่อยาต้านจุลชีพจำนวน 12 ชนิด พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทรวมถึงสายพันธุ์อ้างอิงดื้อ (resistant) ต่อยา Amoxycillin (10 µg), Sulphamethoxazole (25 µg), Fosfomycin (50 µg), Lincomycin (2 µg) และ Oxytetracycline (30 µg) ทุกไอโซเลทที่คัดแยกได้จากอุจจาระเด็กทารกดื้อต่อยา Erythromycin (15 µg) แต่ไอโซเลทที่คัดแยกจากสุกร (ยกเว้น P1-P01) รวมถึงสายพันธุ์อ้างอิงไว (sensitive) ต่อยานี้ ทุกไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและสายพันธุ์อ้างอิงดื้อต่อยา Gentamicin (10 µg) แต่ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากอุจจาระเด็กทารก คือ H1-05, H9-04, H10-01, H10-03 และ H10-05 ไวต่อยานี้ ทุกไอโซเลทที่คัดแยกได้จากสุกรและไอโซเลท H1-01, H9-06, H10-01, H10-03 และ H10-05 ดื้อต่อยา Doxycyclin (30 µg) ส่วนไอโซเลท H9-01, H9-03, H9-05 และสายพันธุ์อ้างอิงไวต่อยานี้ ทุกไอโซเลทที่คัดแยกได้จากสุกร (ยกเว้น P9-P01) และ H1-05, H9-04, H9-05 รวมถึงสายพันธุ์อ้างอิงดื้อต่อยา Colistin sulphate (10 µg) ส่วนไอโซเลท H9-01, H9-02, H9-03, H9-06, H10-01, H10-03 และ H10-05 ไวต่อยานี้

ไอโซเลท H1-05, P4-S03, P8-S01 และ P8-S03 ดื้อต่อยา Lincomycin 109 (109 µg) ส่วนไอโซเลทที่เหลือรวมถึงสายพันธุ์อ้างอิงถูกยับยั้งได้ด้วยยาชนิดนี้ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 15-45 มิลลิเมตร ยา Enrofloxacin (5 µg) และ Neomycin (30 µg) สามารถยับยั้งเชื้อทุกไอโซเลทที่แยกได้จากสุกร อุจจาระเด็กทารกและสายพันธุ์อ้างอิง โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 11-52 มิลลิเมตร และ 12-40 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-7, ภาพที่ 4-2 และตาราง จ-14 (ภาคผนวก จ)



ภาพที่ 4-26 การทดสอบความไวต่อยาต้านจุลชีพของ *B. animalis* subsp. *lactis* ไอโซเลท H10-03 ต่อยา E, Erythromycin (15 µg); CT, Colistin sulphate (10 µg) และ ENR, Enrofloxacin (5 µg)

ตารางที่ 4-7 ความไวต่อยาต้านจุลชีพของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

ไอโซเลท	ขนาดของ Inhibition zone (mm.)											
	AML	E	STX	FOS	MY	N	CT	ENR	CN	LS	DO	OT
H1-05	R	R	R	R	R	30±0	R	52±0	S (32±0)	R	R	R
H9-01	R	R	R	R	R	30±0	S (24±0)	20±0	I (13±0)	45±0	S (30±0)	R
H9-02	R	R	R	R	R	20±0	S (10±0)	17±0	I (13±0)	20±0	I (14.33±0.58)	R
H9-03	R	R	R	R	R	20±0	S (20±0)	17±0	R (10±0)	42±0	S (20±0)	R
H9-04	R	R	R	R	R	12±0	R	15±0	S (15±0)	35±0	S (30±0)	R
H9-05	R	R	R	R	R	13±0	R	15.67±0.58	R (10±0)	43±0	S (21±0)	R
H9-06	R	R	R	R	R	13.67±1.53	S (15±0)	20±0	I (13.67±0.58)	20±0	R (12±0)	R
H10-01	R	R	R	R	R	12±0	S (20±0)	25.33±0.58	S (20±0)	15±0	R (10.67±0.58)	R
H10-03	R	R	R	R	R	20±0	S (20±0)	30±0	S (20±0)	25±0	R (11±0)	R
H10-05	R	R	R	R	R	20±0	S (22±0)	30±0	S (20±0)	25±0	R (11±0)	R

หมายเหตุ 1. AML, Amoxycillin (10 µg); E, Erythromycin (15 µg); STX, Sulphamethoxazole (25 µg); FOS, Fosfomycin (50 µg); MY, Lincomycin (2 µg); N, Neomycin (30 µg); CT, Colistin sulphate (10 µg); ENR, Enrofloxacin (5 µg); CN, Gentamicin (10 µg); LS, Lincomycin 109 (109 µg); DO, Doxycyclin (30 µg); OT, Oxytetracycline (30 µg)

2. R หมายถึง Resistant , I หมายถึง Intermediate , S หมายถึง Sensitive

ตารางที่ 4-7 (ต่อ)

ไอโซเลท	ขนาดของ Inhibition zone (mm.)											
	AML	E	STX	FOS	MY	N	CT	ENR	CN	LS	DO	OT
P1-P01	R	I (18±0)	R	R	R	33±0	R	11±1.00	R	25±0	R	R
P4-S01	R	S (27±1)	R	R	R	25.67±0.58	R	19.67±0.58	R	23.67±0.58	R	R
P4-S03	R	S (25±0)	R	R	R	24±0	R	20±0	R	R	R	R
P8-S01	R	S (40±0)	R	R	R	33.33±0.58	R	20±0	R	R	R	R
P8-S03	R	S (40±0)	R	R	R	30±0	R	20±0	R	R	R	R
P9-P01	R	S (44±0)	R	R	R	40±0	S (21±0)	15±0	R	30±0	R	R
B. animalis subsp. *animalis* ATCC 25527	R	S (30±0)	R	R	R	33±0	R	56±0	R	40±0	S (30±0)	R

หมายเหตุ 1. AML, Amoxycillin (10 µg); E, Erythromycin (15 µg); STX, Sulphamethoxazole (25 µg); FOS, Fosfomycin (50 µg); MY, Lincomycin (2 µg); N, Neomycin (30 µg); CT, Colistin sulphate (10 µg); ENR, Enrofloxacin (5 µg); CN, Gentamicin (10 µg); LS, Lincomycin 109 (109 µg); DO, Doxycyclin (30 µg); OT, Oxytetracycline (30 µg)

2. R หมายถึง Resistant , I หมายถึง Intermediate , S หมายถึง Sensitive

4.7 การยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (Inhibition of pathogen growth)

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคจำนวน 6 สกุล ได้แก่ *S.* Enteritidis DMST 15676, *S.* Typhimurium DMST 15674, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 และ *S. aureus* ATCC 6538 โดยวิธี overlay method

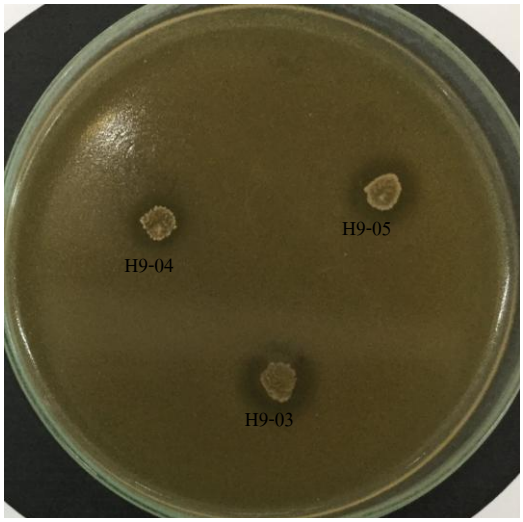
ผลการทดสอบ (ตารางที่ 4-8) พบว่าเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* ทุกไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 และ *S.* Enteritidis DMST 15676 ได้โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 8-14 มิลลิเมตร และ 10-15 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยไอโซเลท H9-01 ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดคือ 14 มิลลิเมตร และ 15 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งให้ผลเท่ากับสายพันธุ์อ้างอิง ทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S.* Typhimurium DMST 15674 ได้โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 8-14 มิลลิเมตร โดยไอโซเลท H9-01 และ H9-02 ให้ขนาดบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดคือ 14 มิลลิเมตร ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์อ้างอิงที่มีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 13 มิลลิเมตร และทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 6538 ได้โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 8-13 มิลลิเมตร โดยไอโซเลท H9-01 (ภาพที่ 4-27) ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดคือ 12 มิลลิเมตร ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์อ้างอิงที่มีขนาดบริเวณเส้นผ่านศูนย์กลางของยับยั้งเท่ากับ 11 มิลลิเมตร

นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* ทุกไอโซเลทยกเว้น P4-S01, P4-S03 และ P8-S01 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. aerogenes* ATCC 13048 ได้โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 8-12 มิลลิเมตร โดยไอโซเลท H9-05 ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดคือ 12 มิลลิเมตร ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์อ้างอิงที่มีขนาดบริเวณยับยั้งเท่ากับ 6.67 มิลลิเมตร และทุกไอโซเลทยกเว้น H9-03, H9-05, H10-01, H10-03 และ H10-05 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Ps. aerugenosa* ATCC 27853 ได้โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งตั้งแต่ 7.67-11.33 มิลลิเมตร โดยไอโซเลท H9-05 ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งกว้างที่สุดคือ 12 มิลลิเมตร ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์อ้างอิงที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 8 มิลลิเมตร

ตารางที่ 4-8 การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของ *B. animalis* subsp. *lactis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

ไอโซเลท	ขนาด Inhibition zone (mm.)					
	E. coli ATCC 25922	*S.* Enteritidis DMST 15676	*S.* Typhimurium DMST 15674	*E. aerogenes* ATCC 13048	*Ps. aerugenosa* ATCC 27853	*S. aureus* ATCC 6538
H1-05	10.33±1.53	13.00±0	12.00±1.00	10.00±0	10.00±0	10.00±0
H9-01	14.00±0	15.00±0	14.00±0	12.00±0	11.33±1.15	13.00±0
H9-02	13.00±0	13.00±0	14.00±0	10.00±0	11.00±0	11.00±0
H9-03	13.00±0	13.00±0	10.00±0	8.00±0	-	11.00±0
H9-04	10.33±1.53	10.00±0	10.00±0	9.00±0	8.00±0	8.00±0
H9-05	12.00±0	13.00±0	13.00±0	12.00±0	-	10.00±0
H9-06	8.00±0	11.33±1.04	10.67±0.58	9.00±0	8.33±0.58	9.33±1.53
H10-01	8.00±0	10.00±0	10.00±0	8.00±0	-	10.00±0
H10-03	8.00±0	10.67±0.58	10.33±0.58	8.67±0.58	-	8.00±0
H10-05	9.00±0	10.00±0	8.00±0	8.67±0.58	-	8.00±0
P1-P01	9.33±0.58	10.33±0.58	8.67±0.58	10.00±0	8.33±0.58	10.00±0
P4-S01	10.00±0	11.33±1.53	10.00±0	-	8.33±0.58	10.00±0
P4-S03	10.00±0	12.00±0	9.33±1.15	-	10.00±0	10.00±0
P8-S01	12.00±0	10.00±0	10.00±0	-	10.00±0	10.00±0
P8-S03	10.00±0	10.00±0	10.67±0.58	8.00±0	7.67±0.76	10.00±0
P9-P01	10.00±0	10.00±0	9.33±1.15	8.00±0	8.00±0	10.00±0
B. animalis subsp. *animalis* ATCC 25527	14.00±0	15.00±0	13.00±0	6.67±0.58	8.00±0	11.00±0

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่พบบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone)



ภาพที่ 4-27 บริเวณยับยั้งของ *B. animalis* subsp. *lactis* ไอโซเลท H9-03, H9-04 และ H9-05 ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 6538

เมื่อนำคุณสมบัติโปรไบโอติกของ *B. animalis* subsp. *lactis* ที่คัดเลือกได้มาสรุปเพื่อเป็นแนวทางในการคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติเด่น ๆ เพื่อที่จะนำไปใช้งานพบว่ามี *B. animalis* subsp. *lactis* จำนวน 4 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01, H9-02 และ P8-S01 ที่มีคุณสมบัติดีที่สุดในทุกการทดสอบ คือ สามารถทนกรดที่ pH 2 ได้นานสูงสุด 4 ชั่วโมง ทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ได้นานสูงสุด 4 ชั่วโมง มีความสามารถในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้จัดอยู่ในระดับสูง และสามารถทนอุณหภูมิได้สูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีกว่า *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 อย่างไรก็ตามในจำนวน 4 ไอโซเลทนี้มี 3 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01 และ H9-02 ที่ไม่สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ ส่วนไอโซเลท P8-S01 สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ในระดับดี ดังแสดงในตารางที่ 4-9

B. animalis subsp. *lactis* ไอโซเลทที่มีคุณสมบัติรองลงมา ได้แก่ ไอโซเลท H9-06 ซึ่งสามารถทนกรดที่ pH 2 ได้นาน สูงสุด 4 ชั่วโมง ทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ได้นานสูงสุด 4 ชั่วโมง มีความสามารถในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ในระดับสูง แต่ทนอุณหภูมิได้สูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียส และไม่สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ ดังแสดงในตารางที่ 4-9

ส่วน *B. animalis* subsp. *lactis* ไอโซเลท P4-S03 และ P8-S03 มีความสามารถในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ในระดับสูง สามารถทนอุณหภูมิได้สูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ในระดับดี แต่แตกต่างกันตรงที่ไอโซเลท P4-S03

สามารถทนกรดที่ pH 2 ได้นานสูงสุด 4 ชั่วโมง และทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ได้นาน 3 ชั่วโมง ส่วนไอโซเลท P8-S03 สามารถทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ได้นานสูงสุด 4 ชั่วโมง แต่ทนสภาวะกรดที่ค่า pH 2 ได้นานสูงสุด 2 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4-9

ส่วน *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 ที่ใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงพบว่าสามารถทนกรดที่ pH 2 ได้นาน สูงสุด 4 ชั่วโมง ทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ได้นานสูงสุด 4 ชั่วโมง สามารถยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ในระดับสูง สามารถทนอุณหภูมิได้สูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียส และไม่สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ ดังแสดงในตารางที่ 4-9

ตารางที่ 4-9 การเปรียบเทียบคุณสมบัติโปรไบโอติกของ *B. animalis* subsp. *lactis* ที่คัดเลือกได้

ไอโซเลท	คุณสมบัติโปรไบโอติก				
	ทนกรดที่ pH 2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (% การรอดชีวิต มากกว่า 85 %)	ทนเกลือน้ำดีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (% การรอดชีวิต มากกว่า 85 %)	ยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้	เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน	ทนอุณหภูมิสูง (°C)
H1-05	✓	✓	สูง	ไม่เจริญ	60
H9-01	✓	✓	สูง	ไม่เจริญ	60
H9-02	✓	✓	สูง	ไม่เจริญ	60
H9-03	X	X	สูง	ไม่เจริญ	55
H9-04	X	✓	สูง	ไม่เจริญ	60
H9-05	X	✓	สูง	ไม่เจริญ	55
H9-06	✓	✓	สูง	ไม่เจริญ	55
H10-01	X	✓	สูง	ไม่เจริญ	55
H10-03	X	X	ปานกลาง	ไม่เจริญ	55
H10-05	X	X	ปานกลาง	ดี	55
P1-P01	X	X	ปานกลาง	ดี	52
P4-S01	X	✓	ต่ำ	ดี	60
P4-S03	✓	X	สูง	ดี	60
P8-S01	✓	✓	สูง	ปานกลาง	60
P8-S03	X	✓	สูง	ดี	60
P9-P01	X	X	ต่ำ	ปานกลาง	52
B. animalis subsp. *animalis* ATCC 25527	✓	✓	สูง	ไม่เจริญ	55

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผล

5.1 อภิปรายผล

จากการเก็บตัวอย่างอุจจาระเด็กทารก ตัวอย่างน้ำนมและมูลสุกร และตัวอย่างลำไส้ไก่ พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียจำนวน 44 ไอโซเลท ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับ *Bifidobacterium* spp. โดยเซลล์แบคทีเรียมีรูปร่างท่อน บางเซลล์โค้ง บางเซลล์เป็นกระบอง มักเรียงตัวเป็นเส้นสาย ซ้อนกันคล้ายรั้ว บางครั้งเรียงตัวเป็นรูปตัววี ตัววาย แกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่และมีคุณสมบัติทางชีวเคมีตรงกับ *Bifidobacterium* spp. ได้แก่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสและออกซิเดส ไม่รีดิวซ์ไนเตรต สามารถสร้างกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคสหมักน้ำตาลแบบ heterofermentative และมีกิจกรรมของเอนไซม์ F6PPK

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 44 ไอโซเลท ไปจัดจำแนกเพื่อยืนยันว่าเป็น *Bifidobacterium* spp. ปรากฏว่าตรวจไม่พบ PCR amplicons จากจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่คัดแยกมาจากน้ำนมแม่สุกรและจากลำไส้ส่วนต่าง ๆ ของไก่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไอโซเลทเหล่านี้ไม่ใช่ *Bifidobacterium* spp. แม้ว่าจะมีสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีที่ตรงกับคุณสมบัติของ *Bifidobacterium* spp. ก็ตาม สาเหตุที่เป็นเช่นนี้มีความเป็นไปได้สูงที่ไอโซเลทเหล่านี้จะเป็นแบคทีเรียสกุลอื่น เช่น *Lactobacillus* spp. ที่มีสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีที่คล้ายกับ *Bifidobacterium* spp. การใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น PCR จึงเป็นการช่วยพิสูจน์ว่าการพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีไม่เพียงพอสำหรับการระบุสกุลของ *Bifidobacterium* spp. นอกจากนี้โอกาสที่จะพบ *Bifidobacterium* spp. ในลำไส้ไก่อาจมีอยู่น้อย เนื่องจากแบคทีเรียที่พบเป็นหลักในลำไส้ไก่มักเป็นแบคทีเรียในไฟลัม *Firmicutes* (เช่น *Lactobacillus* spp.) รองลงมาคือแบคทีเรียในไฟลัม *Proteobacteria* และ *Bacteroidetes* ในขณะที่แบคทีเรียในไฟลัม *Actinobacteria* (ซึ่ง *Bifidobacterium* spp. จัดอยู่ในไฟลัมนี้) พบอยู่ในปริมาณที่น้อยมาก (Waite & Taylor, 2014) ซึ่งสนับสนุนการทดสอบของ Arboleya et al., (2011) ซึ่งกล่าวว่าไม่พบ *Bifidobacterium* spp. จากน้ำนมของมนุษย์มาก่อน รวมถึงยังไม่มีรายงานการพบ *Bifidobacterium* spp. จากน้ำนมสุกรซึ่งการศึกษาครั้งนี้ให้ผลเช่นเดียวกัน

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA คล้ายคลึงกับ *B. animalis* subsp. *lactis* AD011 และ YIT 4121 จำนวน 16 ไอโซเลท จาก 44 ไอโซเลท ซึ่งคิดเป็น 36.36 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนไอโซเลททั้งหมดที่คัดแยกได้

มีรายงานการคัดแยกและจำแนก *B. animalis* subsp. *lactis* จากอุจจาระเด็กทารกแรกเกิด (Kharchenko, Cherdyntseva, & Netrusov, 2015) *B. animalis* subsp. *lactis* ที่พบในอุจจาระเด็กทารกนั้นน่าจะมาจากการบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มีจุลินทรีย์โปรไบโอติก (*B. animalis* subsp. *lactis*) เข้าไปแทนการบริโภคน้ำนมมารดา ซึ่งแตกต่างจากสปีชีส์ของ *Bifidobacterium* spp. ที่พบในอุจจาระเด็กทารกที่บริโภคน้ำนมมารดา โดยมีรายงานว่าพบ *B. longum, B. breve, B. bifidum* และ *B. pseudocatenulatum* ในอุจจาระเด็กทารกที่ไม่ทราบอายุ (Alp, Aslim, Suludere, & Akca, 2010) และในอุจจาระเด็กทารกอายุ 10 วันไปจนถึง 3 เดือน (Solis, Reyes-Gavilan, Fernandez, Margolles, & Gueimaonde, 2010) และมีรายงานว่าพบ *B. longum, B. breve, B. bifidum, B. kashiwanohense, B. pseudolongum* และ *B. pseudocatenulatum* ที่มีอายุ 6±0.25 เดือน และบริโภคน้ำนมมารดา (Vazquez-Gutierrez et al., 2015) *B. animalis* subsp. *lactis* ถูกนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์นมสำหรับเด็กทารก เนื่องจากได้รับการรับรองว่าปลอดภัย (generally regarded as safe ; GRAS) โดยองค์การอาหารและยา (FDA) และมีรายงานการศึกษาว่าเป็นสปีชีส์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของเด็กทารก โดยช่วยลดโอกาสของการเกิดอาการท้องร่วงและทำให้หายจากอาการท้องร่วงเร็วขึ้น ช่วยบรรเทาความรุนแรงของโรคผื่นภูมิแพ้ผิวหนัง (atopic eczema) (Gioia, Aloisio, Mazzola, & Biavati, 2014) และช่วยป้องกันและรักษาอาการติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจของทารกได้ (Taipale, Pienihakkinen, Isolauri, Jokela, & Soderling, 2016) มีรายงานการคัดแยกและจำแนก *B. animalis* subsp. *lactis* จากมูลสุกรพันธุ์ Guizhou Xiang โดยเป็นสายพันธุ์ที่มีอัตราการกำจัดคลอเลสเตอรอลสูงที่สุด (Zhang, He, Zhang, Li, & Zhu, 2016) ในขณะที่ Maxwell et al. (2004) รายงานการคัดแยกสปีชีส์อื่น ๆ ของ *Bifidobacterium* spp. (*B. boum*, *B. thermophilum* และ *B. chaerinum*) จากมูลสุกรในช่วงอายุต่าง ๆ *B. animalis* subsp. *lactis* ส่วนใหญ่ถูกนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในอุตสาหกรรมการผลิตนม มีรายงานว่า *B. animalis* subsp. *lactis* ไม่สามารถย่อย oligosaccharides ได้แต่อาจจะสนับสนุนความสามารถของจุลินทรีย์อื่น ๆ ในระบบทางเดินอาหารให้ย่อยสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์และไม่ดูดซึมในลำไส้ดังนั้นจึงถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นโปรไบโอติกในการผลิตอาหารเพื่อการลดน้ำหนักในมนุษย์ เช่น การผลิตนมหรือโยเกิร์ต (Barrangou et al., 2009)

การศึกษาความสามารถในการทนกรดเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกเนื่องจากค่า pH ของน้ำย่อยในกระเพาะอาหารของสัตว์แต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยอาจมีค่าตั้งแต่ 2.0-3.5 ขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการบริโภคอาหาร ระยะการเจริญหรือชนิดของสัตว์ หากแบคทีเรียสามารถทนสภาวะที่เป็นกรดได้ก็จะสามารถอยู่รอดในระบบทางเดินอาหาร

ของสัตว์ได้ (Musikasang et al., 2009) จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* จำนวน 6 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01,H9-02, H9-06, P4-S03 และ P8-S01 สามารถทนกรด pH 2 ที่มี pepsin 0.3 เปอร์เซ็นต์ ได้นานสูงสุดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ มีรายงานวิจัยที่แสดงผลการศึกษาเกี่ยวกับการรอดชีวิตของ *Bifidobacterium* spp. ในระบบน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลองโดย Ranadheera, Evans, Adams, and Baines (2014) รายงานว่า *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 สามารถทนกรดที่ pH 2.0 ที่มี pepsin 0.3 เปอร์เซ็นต์ ได้แค่ 1 นาที แต่เมื่ออยู่ร่วมกับโปรไบโอติกสายพันธุ์อื่น คือ *L. acidophilus* LA-5 และ *Propionibacterium jensenii* 702 พบว่าสามารถรอดชีวิตในสภาวะกรดได้นานขึ้นถึง 180 นาที และผลการศึกษาครั้งนี้ให้ผลการทดสอบดีกว่ารายงานของ Presti et al. (2015) ที่รายงานว่า *B. animalis* subsp. *lactis* PBS 075 สามารถรอดชีวิตในสภาวะที่มีค่า pH 2.0 ได้เป็นเวลา 180 นาที แต่มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงเมื่อเทียบกับสภาวะที่มีค่า pH 3.0, 4.0 และ 5.0 และให้ผลการทดลองดีกว่ารายงานของ Zuo et al. (2016) ที่รายงานว่า *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 สามารถทนกรดในน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลองที่ pH 2.5 ที่มี pepsin 0.3 เปอร์เซ็นต์ ได้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต 70.13±0.26 เปอร์เซ็นต์ Zhang, He, Zhang, Li, and Zhu (2016) ได้ศึกษาคุณสมบัติการทนกรดของ *Bifidobacterium* spp. ที่คัดแยกได้จากมูลสุกรสายพันธุ์ Guizhou Xiang พบว่าแบคทีเรีย 10 ไอโซเลทที่สามารถทนกรดที่ค่า pH 3 (phosphate buffer saline, pH 3.0) ได้นาน 2 ชั่วโมง โดยทั้ง 10 ไอโซเลท มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่า 93 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำแบคทีเรีย 1 ไอโซเลท ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA พบว่าคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ของ *B. animalis* subsp. *lactis* AD011 และ *B. animalis* subsp. *lactis* YIT4121 จากรายงานเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าการรอดชีวิตของ *Bifidobacterium* spp. มีความแตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับสปีชีส์และสายพันธุ์ของ *Bifidobacterium* spp. ชนิดของสารละลายและองค์ประกอบของสารละลายที่ใช้เป็นน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลอง ตลอดจนเวลาที่ใช้ทดสอบที่แตกต่างกัน ซึ่งกลไกที่ *Bifidobacterium* spp. ใช้เพื่อตอบสนองต่อสภาวะที่เป็นกรดภายนอกเซลล์มีอยู่หลายกลไก ไม่ว่าจะเป็นการทำงานของ F_0F_1 ATPase (atpA และ atpD) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีหลายหน่วยย่อยและถูกถอดรหัสมาจากยีนที่อยู่บน ATP operon และทำหน้าที่ขับโปรตอนที่สะสมอยู่ในไซโตพลาสซึมให้ออกไปนอกเซลล์เพื่อเป็นการรักษาสมดุลของปริมาณโปรตอน (Lee & O'Sullivan, 2010) กลไกถัดมาคือการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอะมิโนชนิด branched-chain และการผลิตแอมโมเนียภายในเซลล์ ซึ่งทำหน้าที่จับกับโปรตอนภายในเซลล์ (Gonzalez-Rodriguez, Ruiz, Gueimonde, Margolles, &

Sanchez, 2013) การมีกลไกตอบสนองต่าง ๆ เหล่านี้ช่วยทำให้ *Bifidobacterium* spp. สามารถรอดชีวิตได้ในสภาวะที่เป็นกรดนั่นเอง

การศึกษาคุณสมบัติในการทนน้ำดีเป็นหลักการทั่วไปในการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติก โดยจุลินทรีย์โปรไบโอติกควรที่จะสามารถรอดชีวิตอยู่ในลำไส้ของโฮสต์ได้ จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* จำนวน 10 ไอโซเลท สามารถทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ได้นานสูงสุดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ โดยสามารถทนน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงกว่ารายงานของ Ranadheera et al. (2014) ที่รายงานว่า *B. animalis* subsp. *animalis* BB-12 สามารถรอดชีวิตได้นาน 240 นาที ในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 0.3 % (pH 8.0) สามารถทนน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงกว่าและระยะเวลานานกว่ารายงานของ Zuo et al. (2016) ที่รายงานว่า *B. animalis* subsp. *animalis* BB-12 สามารถรอดชีวิตในสภาวะที่มี oxgall 0.3 เปอร์เซ็นต์ (pH 8.0) ได้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเท่ากับ 0.46 เปอร์เซ็นต์ และ Presti et al. (2015) ที่รายงานว่า *B. animalis* subsp. *lactis* PBS 075 สามารถรอดชีวิตในน้ำย่อยลำไส้จำลอง (pancreatin 0.1 %, bovine bile salts 0.3% และสารอื่น ๆ ได้แก่ โพแทสเซียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์และโซเดียมไบคาร์บอเนต ที่ pH 7.5) ได้นานแค่ 180 นาที สามารถทนน้ำดีและมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่ารายงานของ Andriantsoanirina, Allano, Butel, and Aires (2013) ที่รายงานว่ามี *Bifidobacterium* spp. จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *B. breve, B. longum*, *B. adolescentis*, *B. bifidum* และ *B. pseudocatenulatum* ที่สามารถรอดชีวิตในสภาวะที่มีความเข้มข้นน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง โดยมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเท่ากับ 28.6, 23, 21, 20 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสามารถทนน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงกว่ารายงานของ Zhang et al. (2016) ที่พบว่า *Bifidobacterium* spp. จำนวน 10 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากมูลสุกร สามารถทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ ได้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตมากกว่า 90 ยกเว้นไอโซเลท BZ12, BZ17 และ BZ22 ที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 87.52±0.28, 68.32±0.12 และ 61.27±0.29 ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท BZ25 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงที่สุด คือ 101.45±0.39 เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าคล้ายคลึงกับ *B. animalis* subsp. *lactis* AD011

การที่ *Bifidobacterium* spp. สามารถทนน้ำดีได้เนื่องจากสามารถพัฒนาและปรับตัวได้ในสภาวะที่มีน้ำดี นอกจากนี้การทนน้ำดีในแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์อาจจะแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะทางชีววิทยาของแบคทีเรียด้วย การที่แบคทีเรียกลุ่ม Bifidobacteria สามารถทนน้ำดีได้อาจเกี่ยวข้องกับกลไกการตอบสนองหลายกลไกไม่ว่าจะเป็นการปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์จาก

การถูกทำลายโดยน้ำดีโดยตรง การซ่อมแซมโปรตีนหรือการย่อยสลายโปรตีนที่เสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ การกำจัดสภาวะเครียดในสภาวะที่มีออกซิเจน การซ่อมแซมดีเอ็นเอและการส่งเสริมการสร้างพลังงานโดยการเพิ่ม metabolism ของการเผาผลาญน้ำตาลเป็นต้น (Ruiz, Margolles, & Sanchez, 2013)

คุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกที่ทำการทดสอบลำดับถัดมาคือ การศึกษาความสามารถในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่มีความสำคัญอย่างมากเพราะเป็นจุดเริ่มต้นของการครอบครองพื้นที่ในระบบทางเดินอาหารของสิ่งมีชีวิตและช่วยปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ เมื่อแบคทีเรียเข้าสู่ร่างกายสัตว์ผ่านกระเพาะอาหารแล้วจะสามารถยึดเกาะที่ผนังลำไส้ ระบบภูมิคุ้มกันจะจดจำและยอมให้อยู่ร่วมกัน โดยจุลินทรีย์จะอาศัยอาหารในการเจริญและผลพลอยได้คือโฮสต์จะได้รับสิ่งที่เป็นประโยชน์จากจุลินทรีย์เช่นกัน จึงเป็นการอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกัน (สำนักการแพทย์ทางเลือก, 2556) จากผลการศึกษาพบว่ามีจำนวน 8 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01, H9-02, H9-03, H9-04, H9-05, H9-06 และ H10-01 ที่มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ได้ในระดับสูง ส่วนอีก 3 ไอโซเลท คือ H10-03, H10-05 และ P1-P01 มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะในระดับปานกลาง ส่วน *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 พบว่ามีประสิทธิภาพในการยึดเกาะ 62.31 เปอร์เซ็นต์ *S.* Enteritidis DMST 15676 มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะ 66.48 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสายพันธุ์ข้างต้นถูกนำมาใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงเนื่องจากมีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่า *S.* enterica serovar Typhimurium สามารถยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้มนุษย์ได้ (Collado, Meriluoto, & Salminen, 2007) ส่วน *B. subtilis* ATCC 6633 จากรายงานของ นภาพร เลิศวรปรีชา, (2550) พบว่าไม่มีคุณสมบัติในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ของ *E. faecium*

จากผลการศึกษานี้พบว่าประสิทธิภาพในการยึดเกาะกับเยื่อเมือกผนังลำไส้มีค่าสูงกว่าที่มีรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ โดย Gueimonde, Noriega, Margolles, Reyes-Gavilan, and Salmimen (2005) รายงานว่า *Bifidobacterium* spp. แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการยึดเกาะ human mucus ได้แตกต่างกัน โดย *B. animalis* 4549dOX สามารถยึดเกาะ human mucus ได้ดีโดยมีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะ 14.5±3.6 ในบัฟเฟอร์ที่ไม่เติมน้ำดี แต่ในบัฟเฟอร์ที่มีน้ำดี 0.3 % พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะลดลงอยู่ที่ 10.1±1.2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำดี 0.3% จะลดความสามารถในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ของ *Bifidobacterium* spp. ได้ และ Collado, Meriluoto, and Salminen (2007) รายงานว่า *B. breve* Bb99 สามารถยึดเกาะ human intestinal mucus ได้โดยมีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะเท่ากับ 2.5 อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาที่แสดงประสิทธิภาพในการยึดเกาะโดยใช้ค่า Resonance unit แทนเปอร์เซ็นต์

การยึดเกาะ โดย Nishiyama et al. (2014) ศึกษาการยึดเกาะของ *Bifidobacterium* ใน mucins จากลำไส้สุกร mucins ที่สกัดได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี filtration chromatography และวิธี density-qradient ultracentrifugation ตามลำดับ จากการศึกษาการยึดเกาะของ *Bifidobacterium* ด้วยวิธี Biacore assays พบว่าในจำนวน 22 สายพันธุ์ที่ทำการทดสอบสามารถยึดเกาะ crude mucin และ purified mucin ได้แตกต่างกัน โดยมีประสิทธิภาพในการยึดเกาะตั้งแต่ 31.5±22.9 ถึง 190.6±10.8 RU (Resonance unit) ตามลำดับ โดย *B. seudolongum* subsp. *pseudolongum* PNC-2-9G ยึดเกาะกับ purified mucin ได้ดีที่สุด นอกจากนี้บางสายพันธุ์ เช่น *B. animalis* subs. *lactis* MCC-0525 ยึดเกาะกับ purified mucin ได้ดีกว่า crude mucin ในขณะที่สายพันธุ์อื่น เช่น *B. bifidum* ATCC 15696 ยึดเกาะกับ crude mucin ได้ดีกว่า purified mucin

สาเหตุที่ *Bifidobacterium* spp. สามารถยึดเกาะกับ epithelial cells ของโฮสต์ได้นั้น อาจเป็นเพราะ *Bifidobacterium* spp. มีระยางค์ประเภท pili หรือมีกิจกรรมของเอนไซม์ moonlighting protein transaldolase เป็นต้น (Grimm, Westermann, & Riedel, 2014)

การศึกษาความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน เนื่องจากเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ส่วนใหญ่จัดเป็นเชื้อที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (strict anaerobe) แต่ก็มีบางสายพันธุ์ที่มีเอนไซม์ที่สามารถเมตาบอไลซ์ออกซิเจนได้จึงสามารถรอดชีวิตในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจน 1-21 เปอร์เซ็นต์ได้ (Zhang et al., 2016) ซึ่งในกระบวนการผลิตจุลินทรีย์โปรไบโอติก เช่น การทำ spray drying หรือ freeze dried มีขั้นตอนที่ต้องมีการสัมผัสกับออกซิเจน การศึกษานี้จะช่วยให้สามารถคัดเลือก *Bifidobacterium* spp. ที่ทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนได้ (Simpson et al., 2005) จากผลการศึกษาพบว่ามี *B. animalis* subsp. *lactis* จำนวน 7 ไอโซเลท (คิดเป็น 43.75 เปอร์เซ็นต์) ที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สามารถคัดแยกไอโซเลทที่สามารถทนออกซิเจนได้จำนวนมากกว่าแต่เป็นสปีชีส์ที่แตกต่างจากรายงานของ Andriantsoanirina et al. (2013) ที่ศึกษาการเจริญ *Bifidobacterium* spp. ในสภาวะที่มีออกซิเจนพบว่ามีจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ *B. longum*, *B. dentium*, *B. bifidum*, *B. breve, B. pseudocatenulatum* และ *B. adolescentis* ที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสอดคล้องกับรายงานของ Simpson et al. (2005) ที่รายงานว่าระดับการทนออกซิเจนของ *Bifidobacterium* spp. แต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน เช่น *B. adolescentis* NCMB 2204, NCMB 2236 สามารถเจริญได้น้อยในสภาวะที่มีออกซิเจน *B. animalis* spp. *animalis* DSMZ 20104, *B. animalis* spp. *lactis* DSMZ 20105 สามารถเจริญได้ดีปานกลางในสภาวะที่มีออกซิเจน และ *B. boum* LMG 10736 สามารถเจริญได้ดีมากในสภาวะที่มีออกซิเจน เป็นต้น จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า *B. animalis* subsp. *lactis* จำนวน 7 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญ

ในสภาวะที่มีออกซิเจนได้มีค่า RBGR อยู่ในช่วง 0.741±0.001 ถึง 1.127±0.024 ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าที่รายงานไว้โดย Maxwell et al. (2004) ที่ศึกษาพบว่า *Bifidobacterium* spp. แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการทนออกซิเจนได้แตกต่างกัน โดยพบว่ามีค่า RBGR อยู่ในช่วง 0.3-0.95 โดย *B. boum* strain 7 และ *B. boum* strain 13 มีค่า RBGR เท่ากับ 0.3-0.35, *B. boum* DSM 20432 มีค่า RBGR 0.95, *B. thermophilum* strain 23, 28, 29 และ 30 มีค่า RBGR 0.4-0.5 และ *B. thermophilum* DSM 20210 มีค่า RBGR 0.25

ความแตกต่างของระดับการทนออกซิเจนของ *Bifidobacterium* spp. ขึ้นอยู่กับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ช่วยในการกำจัด reactive oxygen species (ROS) เช่น NADH oxidase, NADH peroxidase และ superoxide dismutase (SOD) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการกำจัด reactive oxygen species (ROS) ออกจากเซลล์ การที่ *Bifidobacterium* spp. บางสายพันธุ์ไม่สามารถสร้างเอนไซม์เหล่านี้ได้จึงทำให้ไม่สามารถทนออกซิเจนได้ (Lee & O'Sullivan, 2010) เมื่อออกซิเจนทำปฏิกิริยากับ NADH ด้วยเอนไซม์ NADH oxidase จะทำให้เกิดการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งสามารถสร้างความเสียหายต่อระบบต่าง ๆ ภายในเซลล์ได้ ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกสร้างใน *Bifidobacterium* spp. กลุ่มที่ไวต่อออกซิเจน(O_2-sensitive) (Kawasaki et al., 2006)

การศึกษาความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง มีความสำคัญเนื่องจากในอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก โดยการใช้จุลินทรีย์กลุ่ม *Bifidobacterium* spp. เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นของเชื้อ 10^6-10^7cfu/g หรือ cfu/ml จำเป็นต้องใช้เทคโนโลยีมาช่วยในกระบวนการผลิต โดยเทคโนโลยีที่นิยมใช้อย่างหนึ่งคือ spray drying ซึ่งมีขั้นตอนที่เชื้อจุลินทรีย์ต้องสัมผัสกับอุณหภูมิสูง (60 องศาเซลเซียส) ซึ่งจะส่งผลต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ (Simpson et al., 2005) เนื่องจากต้องใช้อุณหภูมิสูงทำให้โอกาสในการรอดชีวิตของจุลินทรีย์น้อยลงเนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ ไรโบโซมและดีเอ็นเอของจุลินทรีย์จะถูกทำลาย การศึกษาความสามารถในการทนอุณภูมิสูงจะสามารถนำไปใช้ในการปรับสภาวะต่าง ๆ ในกระบวนการผลิตเพื่อให้แบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ (Simpson et al., 2005) จากผลการศึกษาพบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มี *B. animalis* subsp. *lactis* จำนวน 8 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01, H9-02, H9-04, P4-S01, P4-S03, P8-S01 และ P8-S03 ที่มีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาแตกต่างกัน โดยไอโซเลท P8-S01 สามารถทนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้นานสูงสุดเป็นเวลา 30 นาที ดังนั้นทั้ง 8 ไอโซเลท ดังกล่าวจึงจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความสามารถในการทนอุณหภูมิในระดับสูง ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สูงกว่าที่รายงานไว้โดย Simpson et al. (2005) ที่รายงานว่า *Bifidobacterium* spp. แต่ละสปีชีส์ มีระดับการทนอุณหภูมิสูงได้แตกต่างกันออกไป โดย *B. animalis* spp. *animalis* DSMZ 20104, *B. animalis* spp. *lactis* JCM 7117, *B. animalis* spp.

lactis DSMZ 20105 และ *B. animalis* spp. *lactis* BB12 สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ในระดับสูง โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 60 องศาเซลเซียส เท่ากับ 1.9±0.1, 65.4±6.9, 1.3±0.9 และ 1.2±0.2 ตามลำดับ

การศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพมีความสำคัญ เนื่องจากในการใช้จุลินทรีย์โปรไบโอติกบางครั้งอาจจะมีการใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะซึ่งยาปฏิชีวนะจะมีผลต่อความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ การใช้ยาปฏิชีวนะร่วมกับจุลินทรีย์โปรไบโอติกอาจจะส่งผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Bifidobacterium* spp. ในระบบทางเดินอาหารได้ (Masco, Van Hoorde, De Brandt, Swings, & Huys, 2006) อย่างไรก็ตาม การศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะในจุลินทรีย์โปรไบโอติกนั้นช่วยป้องกันโอกาสเสี่ยงของการถ่ายโอนยีนดื้อยาให้กับจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของโฮสต์ (Sharma, Tomar, Goswami, Sangwan, & Singh, 2014) และใช้เป็นข้อมูลในการตัดสินใจเลือกเชื้อ *Bifidobacterium* spp. เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกต่อไป (ปิยมาศ ศรีภูมิ และคณะ, 2548) อย่างไรก็ตามยังมีข้อถกเถียงกันอยู่มากว่าในการเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติโปรไบโอติกนั้นควรเลือกแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะหรือเลือกแบคทีเรียที่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะดี ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของการนำเอาโปรไบโอติกนั้นไปใช้ประโยชน์ (นภาพร เลิศวรปรีชา, 2550)

จากการศึกษาพบว่าแต่ละไอโซเลทมีความไวต่อยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยพบว่าทุกไอโซเลทรวมถึงสายพันธุ์อ้างอิงดื้อต่อยา Amoxycillin (10 µg), Sulphamethoxazole (25 µg), Fosfomycin (50 µg), Lincomycin (2 µg) และ Oxytetracycline (30 µg) และทุกไอโซเลทไวต่อยา Neomycin (30 µg) และ Enrofloxacin (5 µg) ส่วนยา Erythromycin (15 µg) พบว่าทุกไอโซเลทที่แยกจากอุจจาระเด็กทารกดื้อต่อยานี้ (คิดเป็น 62.50 เปอร์เซ็นต์) แต่ไอโซเลทที่คัดแยกจากสุกร (ยกเว้น P1-P01) (คิดเป็น 31.50 เปอร์เซ็นต์) ไวต่อยานี้ ยา Gentamicin (10 µg) พบว่าทุกไอโซเลทที่คัดแยกจากสุกร (คิดเป็น 37.50 เปอร์เซ็นต์) ดื้อต่อยานี้ แต่ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากอุจจาระเด็กทารกจำนวน 5 ไอโซเลท ไวต่อยานี้ (คิดเป็น 31.50 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันกับ Moubareck, Gavini, Vaugien, Butel, and Doucet-Populaire (2005) ที่รายงานว่า *B. animalis* subsp. *lactis* จำนวน 8 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้จากมนุษย์ สัตว์และผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกมีความไวต่อยา Erythromycin (15 µg) แต่ดื้อต่อยา Gentamicin (15 µg) และ Masco et al., (2006) ที่รายงานว่า *B. animalis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากมนุษย์ สัตว์และผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก จำนวน 44 ไอโซเลท มีความไวต่อยา Erythromycin (15 µg) และยา Gentamicin (15 µg)

รายงานการศึกษาเกี่ยวกับความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อกลุ่ม *Bifidobacterium* spp. มีอยู่น้อยและนำผลการศึกษามาเปรียบเทียบกันได้ยากเนื่องจากในแต่ละการทดลองใช้สภาวะใน

การทดสอบที่แตกต่างกันมาก อย่างไรก็ตามพบว่า *Bifidobacterium* spp. ส่วนใหญ่ดื้อต่อยา nalidixic acid, gentamicin, kanamycin, metronidazole, neomycin, polymyxin B และ streptomycin โดยมีความไวต่อยาที่ความเข้มข้นต่างกันในแต่ละสปีชีส์โดยอยู่ในช่วงตั้งแต่ 10 ไปจนถึง 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หรือสูงกว่านั้น ในทางตรงกันข้ามยา ampicillin, bacitracin, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, lincomycin, nitrofurantoin, oleandomycin, penicillin G และ vancomycin สามารถยับยั้งเชื้อกลุ่มนี้ได้ และ *Bifidobacterium* spp. แต่ละสายพันธุ์มีความไวต่อยา tetracycline แตกต่างกัน (Ballongue, 2004)

แบคทีเรียกลุ่ม *Bifidobacterium* spp. สามารถสังเคราะห์กรดอินทรีย์และสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เช่น แบคเทอริโอซิน ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่น ๆ การสร้างแบคเทอริโอซินในแต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกัน เช่น *B. longum* สร้างแบคเทอริโอซินชนิด Bifilong ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ หรือ *B. bifidum* NCFB 1454 สร้างแบคเทอริโอซินชนิด Bifidocin B ซึ่งสามารถยับยั้ง *B. cereus, E. faecalis* และ *L. monocytogenes* เป็นต้น (Martinez, Balciunas, Converti, Cotter, & Oliveira, 2013) ในขณะที่ *B. animalis* subsp. *lactis* สามารถผลิตสารคล้ายแบคเทอริโอซินได้ (Balciunas, Arni, Converti, Leblanc, & Oliveira, 2016) ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* ทุกไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922, *S.* Enteritidis DMST 15676, *S.* Typhimurium DMST 15674 และ *S. aureus* ATCC6538 ได้ และบางไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของ *Ps. aerugenosa* ATCC 27853 และ *E. aerogenes* ATCC 13048 ได้อีกด้วย ซึ่งให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับ Presti et al. (2015) ที่รายงานว่า *B. animalis* subsp. *lactis* PBS 075 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 และ *E. coli* ATCC 25922 จากการทดสอบด้วยวิธี agar overlay ได้ และ Zuo et al. (2016) รายงานว่า cell-free supernatants จาก *Bifidobacterium* spp. ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบด้วยวิธี agar-well diffusion สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *S.* enterica ATCC 3076 และ *B. adolescentis* ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ทดสอบสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง *S.* enterica ATCC 3076, *S. aureus* ATCC 25923 และ *E. coli* ATCC 25922 และ Liu, Ren, Song, Wang, and Sun (2015) รายงานว่า *B. animalis* BB04 สร้างแบคเทอริโอซินชนิด bifidocin A ซึ่งสามารถยับยั้ง *E. coli* CGMCC 1.90, *E. coli* ATCC 80739, *Pseudomonas, S.* Enteritidis ATCC 13076 และ *S. aureus* ATCC 6538 ได้

5.2 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและจำแนกแบคทีเรีย *Bifidobacterium* spp. จากตัวอย่างเด็กทารก ไก่ และสุกร พบว่าสามารถคัดแยก *Bifidobacterium* spp. ได้จากตัวอย่างอุจจาระเด็กทารกจำนวน 10 ไอโซเลท (คิดเป็น 45.45 เปอร์เซ็นต์) และจากตัวอย่างมูลสุกรจำนวน 6 ไอโซเลท (คิดเป็น 30 เปอร์เซ็นต์) แต่ไม่สามารถคัดแยกได้จากตัวอย่างลำไส้ไก่ เมื่อนำทั้ง 16 ไอโซเลท มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบว่าทั้ง 16 ไอโซเลท (คิดเป็น 36.36 เปอร์เซ็นต์) สามารถระบุสปีชีส์ได้ว่าเป็น *B. animalis* subsp. *lactis*

เมื่อศึกษาคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกของ *B. animalis* subsp. *lactis* จำนวน 16 ไอโซเลท พบว่ามีจำนวน 4 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01, H9-02 และ P8-S01 ที่มีคุณสมบัติดีที่สุดในทุกการทดสอบคือ สามารถทนกรด pH 2 ที่มี pepsin 0.3 เปอร์เซ็นต์ ได้นานสูงสุด 4 ชั่วโมง ทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ได้นานสูงสุด 4 ชั่วโมง มีความสามารถในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ในระดับสูง และสามารถทนอุณหภูมิได้สูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เหนือกว่า *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ถูกนำมาใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิงในการศึกษาครั้งนี้ และพบสายพันธุ์ที่ทนออกซิเจนได้ดีที่สุดคือ P8-S01 ส่วนอีก 3 ไอโซเลท คือ H1-05, H9-01 และ H9-02 ไม่สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนได้

5.3 ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและจำแนก *Bifidobacterium* spp. จากตัวอย่างเด็กทารก ไก่และสุกร เพื่อนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกโดยทำการทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกในระบบหลอดทดลอง (in vitro) ในการศึกษาลำดับถัดไปจึงควรนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปทำการทดลองในสัตว์ทดลอง (in vivo) เพื่อเป็นการศึกษาถึงประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของสัตว์ เช่น ไก่ สุกร เป็นต้น

2. ในการจัดจำแนก *Bifidobacterium* spp. ในระดับสปีชีส์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่เพิ่มจำนวนได้จากวิธี PCR นั้นควรจะทดสอบกับไพรเมอร์คู่อื่น ๆ ที่สามารถเกาะกับบริเวณอื่นของยีน 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp. เพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจหา *Bifidobacterium* spp. ในตัวอย่างที่นำมาทดสอบ นอกจากนี้ในการระบุแทรกซอนเพื่อยืนยันสปีชีส์อาจทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับสปีชีส์แต่ละสปีชีส์และอาจใช้ยีนอื่น ๆ ในการระบุแทกซอนของ *Bifidobacterium* spp. นอกเหนือจากการใช้เพียงแค่ยีน16S rRNA

3. ควรมีการศึกษาถึงรูปแบบการนำ *Bifidobacterium* spp. ไปใช้งานเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติก กระบวนการ fermentation รวมถึงการเก็บรักษาเชื้อในระยะยาว

4. ควรมีการศึกษาชนิดของสารที่ *Bifidobacterium* spp. ผลิตออกมาแล้วมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค รวมถึงการทำให้บริสุทธิ์และการนำไปงาน

บรรณานุกรม

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. (2557). *จุลชีววิทยาทั่วไป* (พิมพ์ครั้งที่10). กรุงเทพ ฯ : โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นภาพร เลิศวรปรีชา. (2550). *การคัดเลือกเชื้อ Enterococcus faeciumที่แยกได้จากไก่พื้นเมืองที่มีศักยภาพใช้เป็นโปรไบโอติกโดยการทดสอบคุณสมบัติทางห้องปฏิบัติการ*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์, คณะสัตวแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นันทนา อรุณฤกษ์. (2549). *การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอนแอโรบ* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพ ฯ : โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

บุญเสริม ชีวะอิสระกุล และบุญล้อม ชีวะอิสระกุล. (2542). ระบบทางเดินอาหารสัตว์. เข้าถึงได้จาก http://elearning.nsru.ac.th/web_elearning/animals/lesson7_3.php

ปิยมาศ ศรีภูมิ, ภูษิตา วรรณิสสร, พงศธร ประภักรางกูล, บัณฑิต ฝั่งสินธุ์, ดวงทิพย์ มูลมั่งมี, สมพร มูลมั่งมี และสุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์. (2548). *การแยก Bifidobacteria จากอุจจาระเด็กทารกเพื่อใช้เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติก*. กรุงเทพ ฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เยาวมาลย์ ค้าเจริญ และสาโรจน์ ค้าเจริญ. (2535). การใช้สารโปรไบโอติกในอาหารสัตว์. *สาส์นไก่และการเกษตร, 40,* 13-15.

วิจัยกรุงศรี. (2560). *อุตสาหกรรมไก่แช่แข็งและแปรรูป*. เข้าถึงได้จาก https://www.krungsri.com/bank/getmedia /b183a13a-002b-4aa3-8318ae74566d89b6/IO_Chicken_2016_TH.aspx

รินทร์ลภัส กุลพัชรคณาพงษ์. (2555). การใช้สารทดแทนยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์. *สาส์นไก่และสุกร, 10*(111), 44-45.

วารี นิยมธรรม. (2549). *การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกซึ่งมีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกในสัตว์.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์, คณะสัตวแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สินีนาฏ พลโยราช และเมธา วรรณพัฒน์. (2558). ศักยภาพในการใช้ยีสต์เป็นแหล่งโปรไบโอติกในสัตว์เคี้ยวเอื้อง. *แก่นเกษตร, 43*(1), 191-206.

สำนักการแพทย์ทางเลือก กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข. (2556). *โพรไบโอติก : จุลินทรีย์ทางเลือกเพื่อสุขภาพ*. กรุงเทพ ฯ: โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ.

ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. (2560). *ส่งออกอาหารปี 2560 แน้วโน้มดี นำโดยสินค้ากุ้งมูลค่าขยายตัว 11.0 % และไก่ที่ขยายตัว 4.5 %.* เข้าถึงได้จาก https://www.thunhoon.com/% E0%B8%AA %E0%B9%88%E0%B8%87%E0%B8%AD%E0%B8%AD%E0%B8%81%E0%B8% AD%E0%B8%B2%E0%B8%AB%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%9B%E0%B 8%B52560%E0%B9%81%E0%B8%99%E0%B8%A7%E0%B9%82%E0%B8%99% E0%B9%89%E0%B8%A1%E0%B8%94/

ศูนย์วิจัยและพัฒนา ธ.ก.ส. (2559). *แนวโน้มเศรษฐกิจโลกและเศรษฐกิจไทยปี 2560.* เข้าถึงได้จาก file:///C:/Users/aoy/Downloads/Outlook%20%E0%B9%80%E0%B8%A8%E0%B8% A3%E0%B8%A9%E0%B8%90%E0%B8%81%E0%B8%B4%E0%B8%88%E0%B9 %84%E0%B8%97%E0%B8%A2%202560%20final.pdf

อุทัย เก้าเอี้ยน. (2549). โปรไบโอติก. *สงขลานครินทร์เวชสาร, 24*(4), 316.

เอกลักษณ์ ทวีโรจนกุล. (2552). Probiotic & Prebiotic คู่หูกู้วิกฤตโรคในระบบทางเดินอาหาร. *Technology Promotion Mag, 203,* 67-68.

Alp, G., Aslim, B., Suludere, Z., & Akca, G. (2010). The role of hemagglutination and effect of exopolysaccharide production on bifidobacteria adhesion to Caco-2 cells in vitro. *Microbiology and Immunology, 54*(11), 658-665.

Althouse, C., Patterson, S., Fedorka-Cray, P., & Isaacson, R. E. (2003). Type 1 fimbriae of *Salmonella Enterica*serovarThyphimurium bine to enterocytes and contribute to colonization of swine in vitro. *Infection and Immunity, 71*(11), 6446-6452.

Andriantsoanirina, V., Allano, S., Butel, M. J., & Aires, J. (2013). Tolerance of *Bifidobacterium* human isolates to bile, acid and oxygen. *Anaerobe, 21*, 39-42.

Arboleya, S., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Solís, G., Salminen, S., de Los Reyes-Gavilán, C. G., & Gueimonde, M. (2011). Characterization and in vitro properties of potentially probiotic Bifidobacterium strains isolated from breast milk. *International Journal of Food Microbiology, 149* (1), 28-36.

Balciunas, E. M., Arni, S. A., Converti, A., Leblanc, J. G., & Oliveira, R. P. S. (2016). Production of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) by Bifidobacterium lactis using whey as a substrate. *International Journal of Dairy Technology, 69*(2), 236-242.

Ballongue, J. (2004). *Lactic acid Bacteria (Bifidobacteria and Probiotic Action)* (3th ed.). New York : Marcel Dekker.

Barrangou, R., Briczinski, E. P., Traeger, L. L., Loquasto, J. R., Richards, M., Horvat, P., Coute Monvoisin, A. C., Leyer, G., Rendulic, S., Steele, J. L., Broadbent, J. R., Oberg, T., Dudley, E. G., Schuster, S., Romero, D. A., & Roberts, R. F. (2009). Comparison of the complete genome sequences of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140 and BI-04 . *Journal of Bacteriology*, 4144-4151.

Bellisle, F., Diplock, A.T., & Hornstra, G. (1998). Functional food science in Europe. *British Journal of Nutrition, 80* (11), S3-S4.

Bengmark, S. (2000). Colonic food : pre-and probiotic. *Annals Journal of Gastroenterol, 95,* S5-S7.

Bevilacqua, L., Ovidi, M., Mattia, E. D., Trovatelli, L.D., & Canganella, F. (2003). Screening of *Bifidobacterium* strains isolated from human faeces for antagonistic activities against potentially bacterial pathogens. *Microbiological Research, 158*, 179-185.

Bunesova, V., Vlkova, E., Killer, J., Rada, V., & Rockova, S. (2012). Identification of *Bifidobacterium* Strains from faeces of lambs. *Small Ruminant Research, 105,* 355-360.

Bunesova, V., Vlkova, J., Rada, V. A, Rockova, S., Svobodova, I., Jebavy, L., & Kmet, V. (2012). *Bifibobacterium animalis* subsp. *lactis* strains isolated from dog faeces. *Veterinary Microbiology, 160,* 501-505.

Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2007). In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International, 40,* 629-636.

Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2007). *Handbook of Probiotics and Prebiotics* (2 nd ed.). America: A Jone wiley & Sonsc.

Chen, Y. J., Min, B. J., Cho, J. H., Kwan, O. S., Son, K. S., Kim, I. H., & Kim, S. J. (2006). Effects of dictary *Enterococcus faecium* SF68 on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics and faecal noxious gas content in finishing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 19*(3), 406-411.

Chung, H. S., Kim, Y.B., Chun, S.L., & Ji, G.E. (1999). Screening and selection of acid and bile resistant Bifidobacteria. *Journal of Food Microbiology, 47,* 25-32.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth Informational Supplement. *Document M100-S17, 27*(1), 52-55.

Dianawati, D., Mishra, V., & Shah, N. P. (2013). Survival of *Bifidobacterium longum* 1941 microencepsulated with proteins and sugars after freezing and freeze drying. *Food research International, 51,* 503-509.

Downes, F.P., & Ito.K. (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (4th ed.). American public health association.

Ehrmann, M.A., Kurzak, P., Bauer, J., & Vogel, R. F. (2002). Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *Journal of Applied Microbiology, 92*, 966-975.

Endo, A., Futagawa Endo, Y., & Dicks, Leon M.T. (2010). Diversity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in feces of herbivores omnivores and carnivores. *Anaerobe, 16,* 590-596.

Erkkila, S., & Petaja, E. (2000). Screening of commericial meat starter culture at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat science, 55,* 297-300.

Franz, C., Holzapfel, W. H., & Stiles, M.E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety. *Journal of Food Microbiology, 47,*1-24.

Fuller, R. (1989). Probiotic in man andanimals. *Journal of Food Biotechnology, 88,* 365-378.

Garrity, G., Staley, J. T., Boone, D. R., De Vos, P., Goodfellow, M., Rainey, F. A., & Schleifer, K. H. (1986). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria.* Williams & Wilkins.

Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotic in animal feeding for safe food production. *Journal of Food Microbiology, 141,* S15-S28.

Gioia, D. D., Aloisio, I., Mazzola, G., & Biavati, B. (2014). *Bifidobacterium*: their impact on gut microbiota composition and their applications as probiotic in infants. *Applied Microbiology* and *Biotechnology, 98*, 563-577.

Gomes, Ana M.P., & Xavier Malcata, F. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus* : biology, biochemical, technological and the rapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology, 10,* 139-157.

Gonzalez-Rodriguez, I., Ruiz, L., Gueimonde, M., Margolles, A., & Sanchez, B. (2013). Factors involved in the colonization and survival of bifidobacteria in the gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters, 340*, 1-10.

Grimm, V., Westermann, C., & Riedel, C.U. (2014). Bifidobacteria-host interactions-an update on colonisation factors. *BioMed Research International*, 1-10.

Gueimonde, M., Noriega, L., Margolles, A., Reyes-Gavilan, C. G., & Salmimen, S. (2005). Ability of *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile to adhere to human intestinal mucus. *International Jounal of Food Microbiology, 101,* 341-346.

Health Protection Agency. (2005). *Enumeration of Bacillus cereus and other Bacillus species, National standard method, SOP F15, issue 1*. London: England.

Health Protection Agency. (2005). *Enumeration of Clostridiumperfringens by membrane filtration, National standard method, SOP W 5, Issue no. 3.1.* London: England.

Jia, L., Shigwedha, N., & Mwandemele, O.D. (2010). Use of Dacid-Zacid and Zbile values in evaluating Bifidobacteria with regard to stomach pH and bile salt sensitivity. *Journal of Food Science, 75,* M14-M18.

Jung, S. J., Honde, R., Baurhoo, B., Zhao, X., & Lee, B. H. (2008). Effects of galacto-oligosaccharides and a *Bifidobacterium lactic*-based probiotic strain on the growth performance and fecal microflora of broiler chickens. *Poultry Science, 87*, 1694-699.

Kawasaki, S., Mimura, T., Satoh, T., Takesa, K., & Niimura, Y. (2006). Response of microaerophilic *Bifidobacterium boum* and *Bifidobacterium thermophilum* to oxygen. *Applied and Environmental Microbiology, 72*, 6854-6858.

Kharchenko, N. V., Cherdyntseva, T. A., & Netrusov, A. I. (2015). New approaches for the isolation of bifidobacterial strains, their molecular characterization, and assessment of their probiotic potential. *Microbiology , 84,* 419-424.

Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review, 12,* 39-86.

Kok, R. G., Waal, A. D., Schut, F., Welling, G. W., Weenk, G., & Hellingwerf, K. J. (1996). Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Applied and Environmental Microbiology, 62,* 3668-3672.

Lee, J.H., & *O'Sullivan*, *D.J.* (*2010*). Genomic insights into Bifidobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews, 74,* 378–416.

Lee, Y. J., Yu, W. K., & Heo, T. R. (2003). Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species isolated from healthy infant faeces. *International Journal of Antimicrobial agents, 21*, 340-346.

Lian, W. C., Hsiao, H. C., & Chou, C. C. (2002). Survival of *Bifidobacteria* after spray-drying. *International Journal of Food Microbiology, 74*, 79-86.

Liu, Z., Jiang, Z., Zhou, K., Li, P., Liu, P., & Zhang, B. (2007). Screening of Bifidobacteria with acquired tolerance to human gastrointestinal tract. *Anaerobe, 13,* 215-219.

Liu, G., Ren, L. R., Song, Z., Wang, C., & Sun, B. (2015). Purification and characteristics of bifidocin A, a novel bacteriocin produced by *Bifidobacterium animalis* BB04 from centenarians intestine. *Food Control, 50*, 889-895.

Masco, L., Van Hoorde, K., De Brandt, E., Swings, J., & Huys, G. (2006). Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium* strains from humans animal and probiotic products. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 58*, 85-94.

Matteuzzi, D., Crociani, F., & Zani, G. (1971). *Bifidobacterium*suis : a new species of the genus *Bifidobacterium* isolates from pig faeces. *Allgemeine Mikrobiologie, 11,* 387-395.

Maxwell, F. J., Duncan, S. H., Hold, G., & Stewart, C. S. (2004). Isolation, growth on prebiotics and probiotic potential of novel Bifidobacteria from pigs. *Anaerobe, 10,* 33-39.

Mc Donald, L.C., Mc Feeters, R. F., Daeschel, M. A., & Fleming, H. P. (1987). A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology, 53,* 1382-1384.

Modesto, M., Rosaria D Aimmo, M., Stefanini, I., Trevisi, P., & De Filippi, S. (2009). A novel strategy to select *Bifidobacterium* strains and prebiotics as natural growth promoter in newly weaned pigs. *Livestock Science, 122,* 248-258.

Morelli, L., & Capurso, L. (2012). FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. *Journal of clinical gastroenterology, 46*, S1-S2.

Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Converti, A., Cotter, P. D., & Oliveira, R. P. D. S. (2013). Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnology Advance, 31,* 482-488.

Moubareck, C., Gavini, F., Vaugien, L., Butel, M. J., & Doucet-Populaire, F. (2005). Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacterium*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *55*, 38-44.

Musikasang, H. A., Tani, A. K. H., & Maneeral, S. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolate from chicken gastrointestinal digestive tract. *Journal of Microbiology Biotechnology, 25,* 1337-1345.

Noriega, L., Gueimonde, M., Sanchez, B., Margolles, A., & Reyes-Gavilan, C.G. (2004). Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistancc to bile salts in *Bifidobacterium. Journal of Food Microbiology, 92,* 79-86.

Nishiyama, K., Kawanabe, A., Miyauchi, H., Abe, F., Tsubokawa, D., Ishihara, K., Yamanmoto, Y., & Mukai, T. (2014). Evaluation of bifidobacterial adhesion to acidic sugar chain of porcins of porcine colonic mucins. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 78*(8), 1444-1451.

Parte, A. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria. Baltimore.* Williams & Wilkins.

Pinto, S. S., Fritzen-Freire, C. B., Benedetti, S., Murakami, F. S., Petrus, J. C. C., Prudencio, E. S., & Amboni, R. D. M. C. (2015). Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect *Bifidobacterium*-Bb-12 microencapsulated by spray drying. *Food Research International, 67,* 400-408.

Presti, I., Orazio, G.D., Labra, M., La Ferla, B., Mezzasalma, V., Bizzaro, G., Giardina, S., Michelotti, A., Tursi, F., Vassallo, M., & Di Gennaro, P. (2015). Evaluation of the probiotic properties of new Lactobacillus and Bifidobacterium strains and their in vitro effect. *Applied Microbiology and Biotechnology, 99*, 5613-5626.

Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2014). Effect of dairy probiotic combinations on in vitro gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion**.** *Journal of functional foods, 8*(C)*,* 18-25.

Ruiz, L., Margolles, A., & Sanchez, B. (2013). Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium. Frontiers in Microbiology, 4,* 1-6.

Russell, D.A., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., & Stanton, C. (2011). Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. *International Journal of Food Microbiology, 149,* 88-105.

Salminen, S., Isolauri, E., & Salminen, E. (1996). Clinical use of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier:successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek, 70,* 347-358.

Santini, C., Baffoni, L., Gaggia, F., Granata, M., Gasbarri, R., Gioia, D. D., & Biavati, B. (2010). Charactization of Probiotic strains : An application as feed additives in poultry against *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Food Microbiology, 141*, S98-S108.

Seifert, S., Firtz, C., Carlini, N., Barth, S. W., Franz, C. M. A. P., & Watzl, B. (2011). Modulation of innate and adaptive immunity by the probiotic *Bifidobacterium longum* PCB133 in turkeys. *Poultry Science, 90,* 2275-2280.

Sharma, P., Tomar, S. K., Goswami, P., Sangwan, V., & Singh, R. (2014). Antibiotic resistance among commercially available probiotic. *Food Research International, 57,* 176-195.

Simpson, P. J., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., & Ross, R. P. (2004). The evaluation of a mupirocin-based selective medium for the enumeration of Bifidobacteria from probiotic animal feed. *Journal of Microbiology Methods, 57*, 9-16.

Simpson, P. J., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2005). Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. *Journal of Applied Microbiology, 99* (3), 493-501.

Solis, G., Reyes-Gavilan, C. G., Fernandez, N., Margolles, A., & Gueimaonde, M. (2010). Establishment and development of lactic acid bacteria and *BBifidobacteria microbiota* in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe, 16,* 307-310.

Strompfova, V., Simonova, M. P., Gancarcikova, S., Mudronova, D., Farbakova, J., Madari, A., & Laukova, A. (2014). Effect of *Bifidobacterium animalis* B/12 administration in healthydogs. *Anaerobe, 28,* 37-43.

Sturkie, P. D. (*1976*). *Avian physiology*. New York : Springer-Verlag. Berlin.

Taipale, T. J., Pienihakkinen, K., Isolauri, E., Jokela, J. T., & Soderling, E. M. (2016). *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in reducing the risk of infections in early childhood. *International Pediatric Research Foundation, 79,* 65-69.

Tanimomo, J., Delcenserie, V., Taminiau, B., Daube, G., Saint-Hubert, C., & Durieux, A. (2016). Growth and freeze-drying optimization of *Bifidobacterium crudilactis*. *Food and Nitrition Science, 7,* 616-626.

Teanpaisan, R., Chooruk, A., Wannun, A., Wichienchot, S., & Piwat, S. (2012). Survival rates of human-derived probiotic Lactobacillus paracasei SD1 in milk powder using spray drying. *Songklanakarin Journal of Science and Technology, 34,* 241-245.

The International Organization for Standardization (ISO). (2014, 15 April). ISO 7218:2007/Amd.1:2013(E). Microbiology of food and animal feeding stuffs-General requirements and guidance for microbiological examinations.

The International Organization for Standardization (ISO). (2007, 15 April). ISO/TS 21872-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection of potentially enterophathogenic *Vibrio* spp.-Part 2 : Detection of species other than *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*.

Thitaram, S. N., Siragusa, G. R., & Hinton Jr, A. (2005). *Bifidobacterium*-selective isolate and enumeration from chicken caeca by a modified oligosaccharide antibiotic-selective agar medium. *Letters in Applied Microbiology, 41,* 355-360.

Turroni, G., Sinderen, D. V., & Ventura, M. (2011). Genemics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium. International Journal of Food Microbiology, 149*, 37-44.

Vazquez-Gutierrez, P., Lacroix, C., Jaeggi, T., Zeder, C., Zimmerman, M. B., & Chassard, C. (2015). Bifidobacteria strains isolates from stools of iron deficient in fants can efficiently sequester iron. *BMC Microbiology, 15*, 1-10.

Ventura, M. E., Reniero, M., & Zink, R. (2001). Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolate from different environments by the species –specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Ecology, 36,* 113-121.

Waite, D. W., & Taylor, M. W. (2014). Characterizing the avian gut microbiota: membership, driving influences, and potential function. *Frontiers in Microbiology , 5,* 1-12.

Williams, B. A., Verstegen, M.W.A., & Tamminga, S. (2001). Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutrition Research Reviews, 14,* 207-227.

Zhang, R., He, L., Zhang, L., Li, C., & Zhu, Q. (2016). Screen of cholesterol-lowering *Bifibobacterium* from quizhou xiang pigs and evaluation of its tolerance to oxygen acid and bile. *Korean Journal of Food Science of Animal Recources, 36*, 37-43.

Zuo, F., Yu, R., Feng, X., Chen, L., Zeng, Z., Khaskheli, G. B., & Chen, S. (2016). Characterization and in vitro properties of potential probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-fed infant feces. *Annals of Microbiology*, *66*(3), 1027-1037.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

1. Bifidobacterium medium (BM agar)

1.1 อาหารพื้นฐาน

1) Casein peptone tryptic digest	10	กรัม
2) Yeast extract	5	กรัม
3) Meat extract	5	กรัม
4) Bacto soytone	5	กรัม
5) Glucose	10	กรัม
6) di-Potassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)	2	กรัม
7) Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.20	กรัม
8) Manganese (II) sulfate monohydrate ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	0.05	กรัม
9) Tween 80	1	กรัม
10) Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
11) L-cysteine hydrochloride monohydrate ($C_3H_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$)	0.50	กรัม
12) Salt solution	40	มิลลิลิตร
13) Resazurin (25 mg/100 ml)	4	มิลลิลิตร
14) Agar	15	กรัม
15) Water	950	มิลลิลิตร

1.2 Salt solution

1) Calcium Chloride Dihydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.25	กรัม
2) Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.50	กรัม
3) di-Potassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)	1.00	กรัม
4) Potassium hydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)	1.00	กรัม
5) Sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	10.00	กรัม
6) Sodium chloride (NaCl)	2.00	กรัม
7) Water	1,000	มิลลิลิตร

<u>วิธีการเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำ 950 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดด้วยไมโครเวฟเพื่อละลายวุ้น หลังจากวุ้นละลายแล้วเติม L-cysteine hydrochloride monohydrate ($C_3H_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$) ผสมให้เข้ากัน ปรับค่า pH ด้วย 8N NaOH เพื่อให้ได้ค่า pH เท่ากับ 6.8±0.2 แบ่งใส่ขวดแก้วใสขนาด

250 มิลลิลิตร ขวดละ 200 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Bifidobacterium medium broth (BM broth)

2.1 อาหารพื้นฐาน

1) Casein peptone tryptic digest	10	กรัม
2) Yeast extract	5	กรัม
3) Meat extract	5	กรัม
4) Bacto soytone	5	กรัม
5) Glucose	10	กรัม
6) di-Potassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)	2	กรัม
7) Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.20	กรัม
8) Manganese (II) sulfate monohydrate ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	0.05	กรัม
9) Tween 80	1	กรัม
10) Sodium chloride (NaCl)	5	กรัม
11) L-cysteine hydrochloride monohydrate ($C_3H_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$)	0.50	กรัม
12) Salt solution	40	มิลลิลิตร
13) Resazurin (25 mg/100 ml)	4	มิลลิลิตร
14) Water	950	มิลลิลิตร

2.2 Salt solution (เตรียมตามข้อ 1.2)

<u>วิธีการเตรียม</u>

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำ 950 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดด้วยไมโครเวฟเพื่อละลายวุ้น หลังจากวุ้นละลายแล้วเติม L-cysteine hydrochloride monohydrate ($C_3H_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$) ผสมให้เข้ากัน ปรับค่า pH ด้วย 8N NaOH เพื่อให้ได้ค่า pH เท่ากับ 6.8±0.2 แบ่งใส่ขวดแก้วใสขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 200 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Thioglycollate broth

ส่วนประกอบ

1) Casein enzymic hydrolysate	17	กรัม
2) Soya peptone	3	กรัม
3) Dextrose	6	กรัม
4) Sodium chloride	2.5	กรัม
5) Sodium thioglycolate	0.5	กรัม
6) L-Cystine	0.25	กรัม
7) Sodium sulphite	0.1	กรัม
8) Hemin	0.005	กรัม
9) Vitamin K1	0.0001	กรัม
10) Sodium bicarbonate	1	กรัม
11) Agar	0.7	กรัม
12) Water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหารสำเร็จรูปมา 31.06 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดด้วยไมโครเวฟเพื่อละลายวุ้น ปรับค่า pH ด้วย 1N NaOH เพื่อให้ได้ค่า pH เท่ากับ 7.0±0.2 แบ่งใส่ขวดแก้วใสขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 200 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Mueller Hinton agar (MHA agar)

ส่วนประกอบ

1) Beef extract	2	กรัม
2) Acid Hydrolysate of Casein	17.5	กรัม
3) Starch	1.5	กรัม
4) Agar	17	กรัม
5) Water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหารสำเร็จรูปมา 34 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดด้วยไมโครเวฟเพื่อละลายวุ้น ปรับค่า pH ด้วย 1N NaOH เพื่อให้ได้ค่า pH เท่ากับ 7.3±0.1

แบ่งใส่ขวดแก้วใสขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 200 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Lactic Bacteria Differential agar (อาหารสำเร็จรูป)

ส่วนประกอบ

1) Casein enzymic hydrolysate	10.0	กรัม
2) Papaic digest of soyabean meal	1.5	กรัม
3) Casein acid hydrolysate	3.0	กรัม
4) Yeast extract	1.0	กรัม
5) Fructose	2.5	กรัม
6) Monopotassium phosphate	2.5	กรัม
7) Bromocresol green	0.055	กรัม
8) Agar	15	กรัม
10) Water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหารสำเร็จรูปมา 35.56 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำ 1000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดด้วยไมโครเวฟเพื่อละลายวุ้น เติม tween 80 ปริมาตร 1 กรัม ผสมให้เข้ากัน ปรับค่า pH ด้วย 1N NaOH เพื่อให้ได้ค่า pH เท่ากับ 7.0±0.2 แบ่งใส่ขวดแก้วสีชาขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 200 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. 20 % glycerol ใน BM broth

ส่วนประกอบ

1) BM broth	80	มิลลิลิตร
2) Glycerol	20	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ BM broth ให้เข้ากัน ปรับค่า pH ด้วย 8N NaOH เพื่อให้ได้ค่า pH เท่ากับ 6.8±0.2 จากนั้นเติม glycerol ลงไปผสม แบ่งใส่หลอดฝาเกลียว ขนาด 10 มิลลิลิตร หลอดละ 4 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. Brain Heart Infusion (BHI) soft agar

ส่วนประกอบ

1) Brain Heart Infusion (BHI) (อาหารสำเร็จรูป)

1.1) Calf brain	200	กรัม
1.2) Beef heart	250	กรัม
1.3) Proteose peptone	10	กรัม
1.4) Dextrose	2	กรัม
1.5) Sodium chloride	5	กรัม
1.6) Disodium phosphate	2.5	กรัม
2) Agar	7	กรัม
3) Water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหารสำเร็จรูป BHI มา 37 กรัม และชั่ง agar มา 7 กรัม ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดด้วยไมโครเวฟเพื่อละลายวุ้น ปรับค่า pH ด้วย 1N NaOH เพื่อให้ได้ค่า pH เท่ากับ 7.4±0.2 แบ่งใส่หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 15x150 มิลลิเมตร หลอดละ 5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. Nutrient agar : NA

ส่วนประกอบ

1) Meat extract	3.0	กรัม
2) Peptone	5.0	กรัม
3) Agar	12.0	กรัม
4) Water	1000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดด้วยไมโครเวฟเพื่อละลายวุ้น ปรับค่า pH ด้วย 1N NaOH เพื่อให้ได้ค่า pH เท่ากับ 7.0±0.2 แบ่งใส่ขวดแก้วใสขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 200 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121±3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. Tryptic soy broth

ส่วนประกอบ

1) Peptone from casein	17.0	กรัม
2) Peptone from soymeal	3.0	กรัม
3) Glucose	2.5	กรัม
4) Sodium chloride	5.0	กรัม
5) Di–Potassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
6) Water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหารสำเร็จรูปมา 30 กรัม นำส่วนผสมทั้งหมดชั่งผสมรวมกัน และใช้ความร้อนในการละลายส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับ pH ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 M HCl เพื่อให้ได้ค่า pH หลังจากการฆ่าเชื้อแล้ว 7.3±0.2 แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ10 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. Anaerobic dilution buffer

ส่วนประกอบ

1) di-Potassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)	0.2925	กรัม
2) Potassium hydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)	0.17625	กรัม
3) Ammonium sulfate $(NH_4)_2SO_4$	0.4425	กรัม
4) Calcium chloride dehydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0.045	กรัม
5) Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.0825	กรัม
6) Resazurin	0.001	กรัม
7) L-cysteine hydrochloride monohydrate ($C_3H_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$)	0.50	กรัม
8) L-ascorbic acid ($C_6H_8O_6$)	0.50	กรัม
9) Water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวดแก้วใสขนาด 500 มิลลิลิตร ขวดละ 225 มิลลิลิตร และแบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 9 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

11. Phosphate buffer saline (PBS)

ส่วนประกอบ

1) Sodium chloride (NaCl)	8	กรัม
2) Potassium chloride (KCl)	0.2	กรัม
3) di-Sodium hydrogen phosphate dehydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)	1.15	กรัม
4) di-Potassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)	0.2	กรัม
5) Water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่า pH ด้วย 1N NaOH เพื่อให้ได้ค่า pH เท่ากับ 7.3±0.2 แบ่งใส่ขวดแก้วใสขนาด 500 มิลลิลิตร ขวดละ 200 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

12. Buffered Nitrate-Motility medium

ส่วนประกอบ

1) Beef extract	3.0	กรัม
2) Peptone	5.0	กรัม
3) Potassium nitrate	5.0	กรัม
4) D-Galactose	5.0	กรัม
5) Glycerol	5.0	กรัม
6) Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	2.5	กรัม
7) Agar	3.0- 5.0	กรัม
8) Water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดด้วยไมโครเวฟเพื่อละลายวุ้น ปรับค่า pH ด้วย 1N NaOH เพื่อให้ได้ค่า pH เท่ากับ 7.3±0.1 แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 9 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

13. Nitrate broth

ส่วนประกอบ

1) Peptone	5.0	กรัม
2) Beef extract	3.0	กรัม
3) Potassium nitrate (KNO_3)	1.0	กรัม
4) Water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับค่า pH ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 M HCl เพื่อให้ได้ค่า pH เท่ากับ 7.0±0.2 แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

14. การเพิ่ม 1 % glucose ลงใน BM broth

14.1 เตรียม 10 % glucose

ส่วนประกอบ

1) Glucose	10.0	กรัม
2) Water	100	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ชั่งน้ำตาลกลูโคสละลายในน้ำ ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 1-5 องศาเซลเซียส

14.2 เตรียม BM broth ที่เติม Bromocresol purple

ส่วนประกอบ

1) BM broth	1000	มิลลิลิตร
2) Bromocresol purple	0.008	กรัม

วิธีเตรียม

ละลาย Bromocresol purple ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BM broth ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่ขวด ขวดละ 90 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อโดย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

14.3 อาหาร 1 % glucose ใน BM broth

ส่วนประกอบ

1) 10 % glucose	10.0	มิลลิลิตร
2) BM broth (จากข้อ 10.2)	90	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

เติม 10% glucose ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหาร BM broth (จากข้อ 12.2) เขย่าให้เข้ากัน เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อในปริมาณ 5 มิลลิลิตร

สารเคมีสำหรับการย้อมแกรมและย้อมสปอร์

1. 5 % malachite green

ส่วนประกอบ

1) malachite green	5.0	กรัม
2) Water	100	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย malachite green ในน้ำจนละลายหมด ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

2. 0.25 % safranin solution

ส่วนประกอบ

1) safranin	0.25	กรัม
2) Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์	10	มิลลิลิตร
3) Water	100	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย safranin ใน Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ จนละลายหมด ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

3. 2 % crystal violet

ส่วนประกอบ

1) crystal violet	2.0	กรัม
2) Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์	20	มิลลิลิตร
3) Ammonium oxalate ($C_2H_8N_2O_4$)	0.8	กรัม
4) Water	80	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย crystal violet ใน Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ และละลาย Ammonium oxalate ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร หลังจากนั้นผสมทั้งสองส่วนเข้าด้วยกัน เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

4. 1 % iodine solution

ส่วนประกอบ

1) iodine	1.0	กรัม
2) Potassium iodine (KI)	2.0	มิลลิลิตร
3) Water	100	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย Potassium iodine (KI) ในน้ำประมาณ 10 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เติม iodine ให้ละลายให้หมด ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบชีวเคมี

1. Nitrite reagent (0.8 %)

ส่วนประกอบ

1.1 Sulfanilic acid reagent

1) Sulfanilic acid	0.8	กรัม
2) Acetic acid (5 mol/l)	100	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย sulfanilic acid ด้วย acetic acid บรรจุในขวดสีชาและเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 1-5 องศาเซลเซียส

1.2 α-naphthol reagent (0.5 %)

ส่วนประกอบ

1) α-naphthol	0.5	กรัม
2) Acetic acid (5 mol/l)	100	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย α-naphthol ด้วย acetic acid บรรจุในขวดสีชาและเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 1-5 องศาเซลเซียส

2. solution I (6 mg Sodium fluoride (NaF) และ 10 mg NA iodoacetate ($C_2H_2INaO_2$) ในน้ำ 1 มิลลิลิตร)

ส่วนประกอบ

1) Sodium fluoride (NaF)	0.006	กรัม
2) NA iodoacetate ($C_2H_2INaO_2$)	0.010	มิลลิลิตร
3) น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย D-fructose-6-phosphate disodium salt hydrate ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

3. D-fructose-6-phosphate disodium salt hydrate ($C_6H_{11}Na_2O_9P.xH_2O$) (ความเข้มข้น 80 mg/l)

ส่วนประกอบ

1) D-fructose-6-phosphate disodium salt hydrate	0.8	กรัม
2) น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย D-fructose-6-phosphate disodium salt hydrate ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

4. Hydroxylamine.hydrochloride ($NH_2OH•HCl$) (140 mg/ml)

ส่วนประกอบ

1) Hydroxylamine.hydrochloride ($NH_2OH•HCl$)	1.4	กรัม
2) น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย Hydroxylamine.hydrochloride ($NH_2OH•HCl$) ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

5. 15 % (w/v) Trichloroacetic acid (TCA)

ส่วนประกอบ

1) Trichloroacetic acid (TCA)	15.0	กรัม
2) น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย Trichloroacetic acid (TCA) ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

6. 4 M HCl

ส่วนประกอบ

1) Hydrochloric acid (HCl)	132	มิลลิลิตร
2) น้ำกลั่น	400	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ตวงน้ำกลั่นใส Hydrochloric acid (HCl) ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 400 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

7. 0.5 % (w/v) Iron (III) chloride hexahydrate ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)

ส่วนประกอบ

1) Iron (III) chloride hexahydrate ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	0.5	กรัม
2) น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย Iron (III) chloride hexahydrate ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

8. Oxidase reagent

ส่วนประกอบ

1) *N,N,N,'N'*-Tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride ($(C_6H_4[N(CH_3)_2]_2 \cdot 2HCl)$	1	กรัม
2) น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย *N,N,N,'N'*-Tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride ($(C_6H_4[N(CH_3)_2]_2 \cdot 2HCl)$ ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร (เตรียมเมื่อต้องการใช้งาน) เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

9. 3 % hydrogen peroxide

ส่วนประกอบ

1) hydrogen peroxide	3	มิลลิลิตร
2) น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย hydrogen peroxide ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

10. 50 mM Sodium carbonate (Na_2CO_3) buffer (pH 9.7)

10.1 Solution A (0.1M sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)

ส่วนประกอบ

1) sodium bicarbonate ($NaHCO_3$)	8.40	กรัม
2) น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

10.2 Solution B (0.1M sodium carbonate decahydrate ($Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$))

ส่วนประกอบ

1) sodium carbonate decahydrate ($Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$)	28.62	กรัม
2) น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย sodium carbonate decahydrate ($Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$) ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

10.3 ผสม Solution A ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กับ Solution B ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 9.7 เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

11. 0.05 M phosphate buffer (pH 6.5)

11.1 Solution I

ส่วนประกอบ

1) potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	1.816	กรัม
2) น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

11.2 Solution II

ส่วนประกอบ

1) dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4)	2.322	กรัม
2) น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย potassium dihydrogen phosphate (K_2HPO_4) ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

11.3 ผสม Solution I ปริมาตร 188.8 มิลลิลิตร กับ Solution II ปริมาตร 11.2 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 6.5 ด้วย Solution I หรือ Solution II เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา ที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีและบัฟเฟอร์

สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและดำเนินปฏิกิริยา PCR

1. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

1.1 TE buffer (pH 8.0)

ส่วนประกอบ

1) Tris-Cl (pH 8.0) ความเข้มข้น 1 โมลาร์	300	ไมโครลิตร
2) EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	60	ไมโครลิตร
3) น้ำกลั่น	30	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ปิเปต Tris-Cl (pH 8.0) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมกับ EDTA ปริมาตร 60 ไมโครลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 30 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งจะได้ Tris-Cl (pH 8.0) ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 มิลลิโมลาร์ EDTA ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์

1.2 Tris-Cl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (pH 8.0)

ส่วนประกอบ

1) Tris base	121.1	กรัม

2) HCl ใช้ปริมาตรตามค่า pH ที่ต้องการดังนี้

pH	HCl	
7.4	70	มิลลิลิตร
7.6	60	มิลลิลิตร
8.0	42	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย Tris base ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.0 โดยเติม HCl ปริมาตร 42 มิลลิลิตร ควรปล่อยให้สารละลายเย็นจนถึงอุณหภูมิห้องก่อนทำการปรับ pH ครั้งสุดท้ายและปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (pH 8.0)

ส่วนประกอบ

1) Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA)	146.12	กรัม
2) Sodium hydroxide (NaOH)	20	กรัม
3) น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) 146.12 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร โดยใช้ magnetic stirrer แล้วปรับ pH ให้เป็น 8.0 โดยค่อย ๆ เติม NaOH จนละลายเข้ากัน วัด pH ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121±3 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ Agarose gel electrophoresis

2.2 50X TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA)

ส่วนประกอบ

1) Tris base	242	กรัม
2) Glacial acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
3) 0.5 M EDTA (pH 8.0)	100	มิลลิลิตร
4) น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย Tris base และ 0.5 M EDTA ในน้ำกลั่น จากนั้นเติม Glacial acetic acid (ทำใน Fume hood) ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.3 6X Gel Loading buffer

ส่วนประกอบ

1) Bromophenol blue	0.25	กรัม
2) Xylene cyanol FF	0.25	กรัม
3) Glycerol	30	มิลลิลิตร
4) น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายสี Bromophenol blue 0.25 กรัม และ Xylene cyanol FF 0.25 กรัม ในน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร จนละลายได้ดี เติม Glycerol 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.4 Ethidium bromide (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ส่วนประกอบ

1) Ethidium bromide	0.1	กรัม
2) น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย Ethidium bromide 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยใช้ magnetic stirrer กวนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เก็บสารละลายในขวดสีชาหรือขวดใสที่หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ค

การคำนวณหาปริมาณเชื้อ *Bifidobacterium* spp. (ISO 7218:2007/Amd.1, 2013)

คำนวณหาปริมาณ *Bifidobacterium* spp. **โดยใช้สูตรดังนี้**

$$N = \frac{\sum C}{V\,(n_1 + 0.1n_2)d}$$

N	คือ	ปริมาณของ *Bifidobacterium* spp. มีหน่วยเป็น cfu/ml
$\sum C$	คือ	ผลรวมของโคโลนีที่เจริญในจานเพาะเชื้อจาก 2 ระดับการเจือจางที่ต่อเนื่อง ซึ่งจำนวนโคโลนีในระดับการเจือจางแรกจะต้องอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี/จาน
V	คือ	ปริมาตรที่ใช้ในการเพาะเชื้อลงในจานเพาะเชื้อในหน่วยมิลลิลิตร (0.1 มิลลิลิตร)
n_1	คือ	จำนวนจานเพาะเชื้อที่ใช้ในการคำนวณจากระดับการเจือจางแรก
n_2	คือ	จำนวนจานเพาะเชื้อที่ใช้ในการคำนวณจากระดับการเจือจางที่สอง
d	คือ	dilution factor ของระดับการเจือจางแรกที่ใช้ในการคำนวณ

<u>ตัวอย่าง</u> ใส่จำนวนตัวอย่างเจือจางในจานเพาะเชื้อ 0.1 มิลลิลิตร

การเจือจางที่ระดับ 10^{-3} นับจำนวนโคโลนีได้ 66 และ 70 โคโลนี

การเจือจางที่ระดับ 10^{-4} นับจำนวนโคโลนีได้ 4 และ 7 โคโลนี

จากสูตร $N = \frac{\sum C}{V\,(n_1 + 0.1n_2)d}$

$$N = \frac{66+70+4+7}{0.1(2+0.1(2))10^{-3}}$$

$$N = \frac{147}{0.22\times10^{-3}}$$

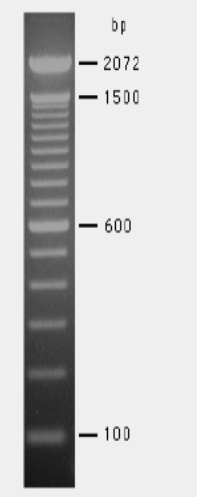
$$N = 668{,}181$$

$$N = 6.7 \times 10^{5} \text{ cfu/ml}$$

ภาคผนวก ง

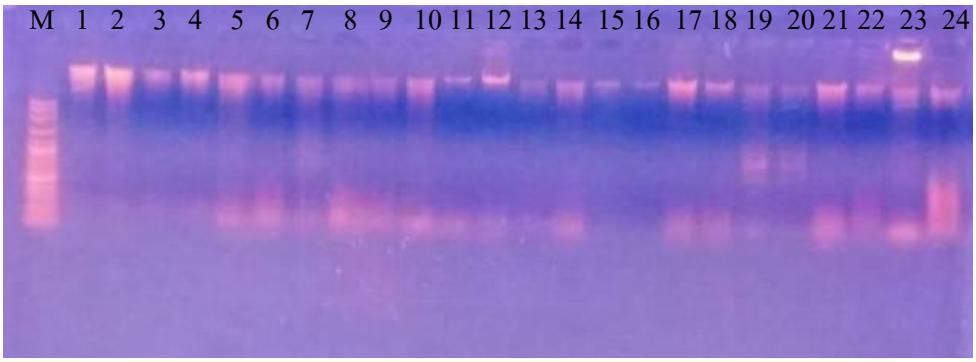
การสกัดดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

1. 100 bp DNA ladder (Invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

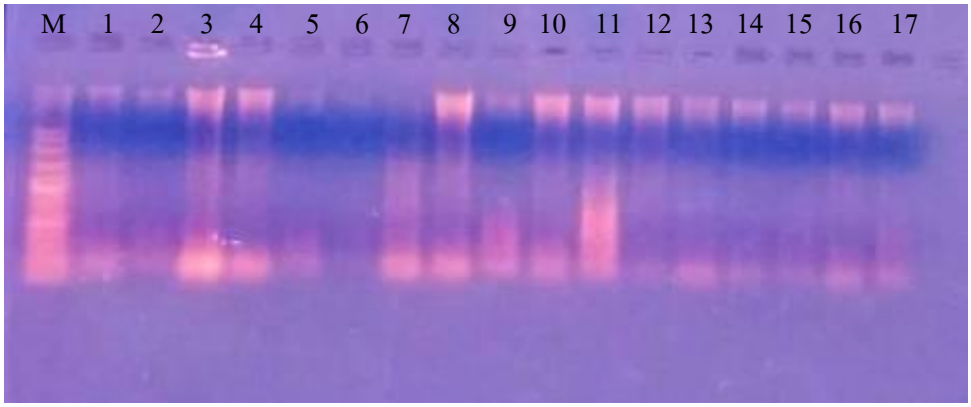


ภาพภาคผนวก ง-1 ชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ของ 100 bp DNA ladder

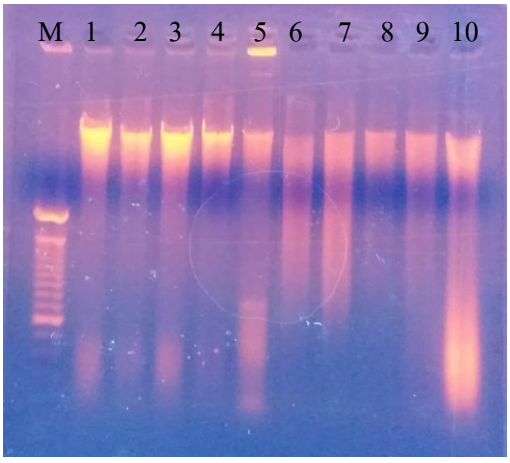
2. ผลการตรวจสอบ genomic DNA ของแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ บนเจลอะกาโรส



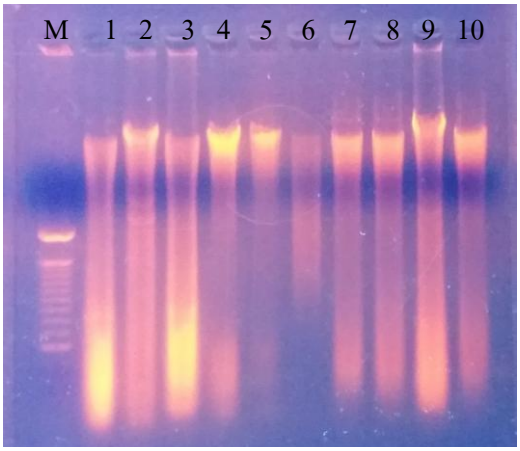
ภาพภาคผนวก ง-2 ผลการตรวจสอบ genomic DNA ของแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2 % ใน 1x TAE buffer ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที M, Marker 100 bp DNA ladder, lane 1,2 =H2-01, lane 3,4 = H3-03, lane 5,6 = H5-02, lane 7,8 = H6-02, lane 9,10 = H7-01, lane 11,12 = H9-01, lane 13,14 = H9-02, lane 15,16 = H9-03, lane 17,18 = H9-04, lane 19,20= H9-05, lane 21,22 = H9-06, lane 23,24 = H10-01



ภาพภาคผนวก ง-3 ผลการตรวจสอบ genomic DNA ของแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ บน เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2 % ใน 1x TAE buffer ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที M, Marker 100 bp DNA ladder, lane 1 =H1-05, lane 2 = H10-03, lane 3 = H10-05, lane 4 =P1-P01, lane 5 = P2-01, lane 6 = P4-S01, lane 7 = P4-S02, lane 8 = P4-S03, lane 9 = P6-P03, lane 10 = P7-P01, lane 11 = P8-S01, lane 12 = P8-S02, lane 13 = P8-S03, lane 14 = P8-S02, lane 15 = P9-P01, lane 16 = C2-C02, lane 17 = C4-C01



ภาพภาคผนวก ง-4 ผลการตรวจสอบ genomic DNA ของแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ บน เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2 % ใน 1x TAE buffer ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที M, Marker 100 bp DNA ladder, lane 1 =H1-05, lane 2 = H9-01, lane 3 = H9-02, lane 4 = H9-03, lane 5 = H9-04, lane 6 = H9-05, lane 7 = H9-06, lane 8 = P1-P01, lane 9 = P4-S01, lane 10 = P4-S03



ภาพภาคผนวก ง-5 ผลการตรวจสอบ genomic DNA ของแบคทีเรียไอโซเลทต่าง ๆ บนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2 % ใน 1x TAE buffer ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที M, Marker 100 bp DNA ladder, lane 1 =H10-01, lane 2 = H10-03, lane 3 = H10-05, lane 4 = P8-S01, lane 5 = P8-S03, lane 6 = P9-P01, lane 7 = P6-P01, lane 8 = P6-P02, lane 9 = P7-P01, lane 10 = P10-P01

3. DNA sequences (16S contigs)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
     5          15         25         35         45         55
TTTTGCGGCA TGGGATGGGG TCGCGTCCTA TCAGCTTGTT GGCGGGGTGA TGGCCCACCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
     65         75         85         95         105        115
AGGCGTTGAC GGGTAGCCGG CCTGAGAGGG TGACCGGCCA CATTGGGACT GAGATACGGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    125        135        145        155        165        175
CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTGGGGA ATATTGCACA ATGGGCGCAA GCCTGATGCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    185        195        205        215        225        235
GCGACGCCGC GTGCGGGATG GAGGCCTTCG GGTTGTAAAC CGCTTTTGTT CAAGGGCAAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    245        255        265        275        285        295
GCACGGTTTC GGCCGTGTTG AGTGGATTGT TCGAATAAGC ACCGGCTAAC TACGTGCCAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    305        315        325        335        345        355
CAGCCGCGGT AATACGTAGG GTGCGAGCGT TATCCGGATT TATTGGGCGT AAAGGGCTCG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    365        375        385        395        405        415
TAGGCGGTTC GTCGCGTCCG GTGTGAAAGT CCATCGCCTA ACGGTGGATC TGCGCCGGGT
```

ภาพภาคผนวก ง-6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp. ไอโซเลท H1-05 (ขนาด 420 คู่เบส)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
     5         15         25         35         45         55
CGTCCTATCA GCTTGTTGGC GGGGTGATGG CCCACCAAGG CGTTGACGGG TAGCCGGCCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    65         75         85         95        105        115
GAGAGGGTGA CCGGCCACAT TGGGACTGAG ATACGGCCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   125        135        145        155        165        175
GTGGGGAATA TTGCACAATG GGCGCAAGCC TGATGCAGCG ACGCCGCGTG CGGGATGGAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   185        195        205        215        225        235
GCCTTCGGGT TGTAAACCGC TTTTGTTCAA GGGCAAGGCA CGGTTTCGGC CGTGTTGAGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   245        255        265        275        285        295
GGATTGTTCG AATAAGCACC GGCTAACTAC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGTAGGGTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   305        315        325        335        345        355
CGAGCGTTAT CCGGATTTAT TGGGCGTAAA GGGCTCGTAG GCGGTTCGTC GCGTCCGGTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   365        375        385        395        405        415
TGAAAGTCCA TCGCCTAACG GTGGATCTGC GCCGGGTACG GGCGGGCTGG AGTGCGGTAG

....|....| ....|...
   425        435
GGGAGACTGG AATTCCCG
```

ภาพภาคผนวก ง-7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp. ไอโซเลท H9-01 (ขนาด 438 คู่เบส)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
     5         15         25         35         45         55
 CCTATCAGCT TGTTGGCGGG GTGATGGCCC ACCAAGGCGT TGACGGGTAG CCGGCCTGAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    65         75         85         95        105        115
AGGGTGACCG GCCACATTGG GACTGAGATA CGGCCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   125        135        145        155        165        175
 GGGAATATTG CACAATGGGC GCAAGCCTGA TGCAGCGACG CCGCGTGCGG GATGGAGGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   185        195        205        215        225        235
 TTCGGGTTGT AAACCGCTTT TGTTCAAGGG CAAGGCACGG TTTCGGCCGT GTTGAGTGGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   245        255        265        275        285        295
TTGTTCGAAT AAGCACCGGC TAACTACGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG TAGGGTGCGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   305        315        325        335        345        355
GCGTTATCCG GATTTATTGG GCGTAAAGGG CTCGTAGGCG GTTCGTCGCG TCCGGTGTGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   365        375        385        395        405        415
AAGTCCATCG CCTAACGGTG GATCTGCGCC GGGTACGGGC GGGCTGGAGT GCGGTAGGGG

....|....| ....|....| ....|...
   425        435        445
AGACTGGAAT TCCCGGTGTA ACGGTGGA
```

ภาพภาคผนวก ง-8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp. ไอโซเลท H9-02 (ขนาด 448 คู่เบส)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
     5         15         25         35         45         55
GCTTTTGCGG CATGGGATGG GGTCGCGTCC TATCAGCTTG TTGGCGGGGT GATGGCCCAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    65         75         85         95        105        115
CAAGGCGTTG ACGGGTAGCC GGCCTGAGAG GGTGACCGGC CACATTGGGA CTGAGATACG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   125        135        145        155        165        175
GCCCAGACTC CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATATTGCA CAATGGGCGC AAGCCTGATG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   185        195        205        215        225        235
CAGCGACGCC GCGTGCGGGA TGGAGGCCTT CGGGTTGTAA ACCGCTTTTG TTCAAGGGCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   245        255        265        275        285        295
AGGCACGGTT TCGGCCGTGT TGAGTGGATT GTTCGAATAA GCACCGGCTA ACTACGTGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   305        315        325        335        345        355
AGCAGCCGCG GTAATACGTA GGGTGCGAGC GTTATCCGGA TTTATTGGGC GTAAAGGGCT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   365        375        385        395        405        415
CGTAGGCGGT TCGTCGCGTC CGGTGTGAAA GTCCATCGCC TAACGGTGGA TCTGCGCCGG

....|...
   425
GTACGGGC
```

ภาพภาคผนวก ง-9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp. ไอโซเลท H9-03 (ขนาด 428 คู่เบส)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
     5         15         25         35         45         55
CCTATCAGCT TGTTGGCGGG GTGATGGCCC ACCAAGGCGT TGACGGGTAG CCGGCCTGAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    65         75         85         95        105        115
 AGGGTGACCG GCCACATTGG GACTGAGATA CGGCCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   125        135        145        155        165        175
GGGAATATTG CACAATGGGC GCAAGCCTGA TGCAGCGACG CCGCGTGCGG GATGGAGGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   185        195        205        215        225        235
TTCGGGTTGT AAACCGCTTT TGTTCAAGGG CAAGGCACGG TTTCGGCCGT GTTGAGTGGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   245        255        265        275        285        295
TTGTTCGAAT AAGCACCGGC TAACTACGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG TAGGGTGCGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   305        315        325        335        345        355
GCGTTATCCG GATTTATTGG GCGTAAAGGG CTCGTAGGCG GTTCGTCGCG TCCGGTGTGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   365        375        385        395        405        415
AAGTCCATCG CCTAACGGTG GATCTGCGCC GGGTACGGGC GGGCTGGAGT GCGGTAGGGG

....|....| ....|....| ....|..
   425        435        445
AGACTGGAAT TCCCGGTGTA ACGGTGG
```

ภาพภาคผนวก ง-10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp. ไอโซเลท H9-04 (ขนาด 447 คู่เบส)

```
 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    5         15         25         35         45         55
GCGTCCTATC AGCTTGTTGG CGGGGTGATG GCCCACCAAG GCGTTGACGG GTAGCCGGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   65         75         85         95        105        115
TGAGAGGGTG ACCGGCCACA TTGGGACTGA GATACGGCCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  125        135        145        155        165        175
AGTGGGGAAT ATTGCACAAT GGGCGCAAGC CTGATGCAGC GACGCCGCGT GCGGGATGGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  185        195        205        215        225        235
GGCCTTCGGG TTGTAAACCG CTTTTGTTCA AGGGCAAGGC ACGGTTTCGG CCGTGTTGAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  245        255        265        275        285        295
TGGATTGTTC GAATAAGCAC CGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGTAGGGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  305        315        325        335        345        355
GCGAGCGTTA TCCGGATTTA TTGGGCGTAA AGGGCTCGTA GGCGGTTCGT CGCGTCCGGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  365        375        385        395        405        415
GTGAAAGTCC ATCGCCTAAC GGTGGATCTG CGCCGGGTAC GGGCGGGCTG GAGTGCGGTA

....|....| ....|....| ....|....|
  425        435        445
GGGGAGACTG GAATTCCCGG TGTAACGGTG
```

ภาพภาคผนวก ง-11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp. ไอโซเลท H9-05 (ขนาด 450 คู่เบส)

```
 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    5         15         25         35         45         55
TTTTGCGGCA TGGGATGGGG TCGCGTCCTA TCAGCTTGTT GGCGGGGTGA TGGCCCACCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   65         75         85         95        105        115
AGGCGTTGAC GGGTAGCCGG CCTGAGAGGG TGACCGGCCA CATTGGGACT GAGATACGGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  125        135        145        155        165        175
CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTGGGGA ATATTGCACA ATGGGCGCAA GCCTGATGCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  185        195        205        215        225        235
GCGACGCCGC GTGCGGGATG GAGGCCTTCG GGTTGTAAAC CGCTTTTGTT CAAGGGCAAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  245        255        265        275        285        295
GCACGGTTTC GGCCGTGTTG AGTGGATTGT TCGAATAAGC ACCGGCTAAC TACGTGCCAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  305        315        325        335        345        355
CAGCCGCGGT AATACGTAGG GTGCGAGCGT TATCCGGATT TATTGGGCGT AAAGGGCTCG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|.
  365        375        385        395        405        415
TAGGCGGTTC GTCGCGTCCG GTGTGAAAGT CCATCGCCTA ACGGTGGATC TGCGCC
```

ภาพภาคผนวก ง-12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp. ไอโซเลท H9-06 (ขนาด 416 คู่เบส)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
     5         15         25         35         45         55
GGGTCGCGTC CTATCAGCTT GTTGGCGGGG TGATGGCCCA CCAAGGCGTT GACGGGTAGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    65         75         85         95        105        115
CGGCCTGAGA GGGTGACCGG CCACATTGGG ACTGAGATAC GGCCCAGACT CCTACGGGAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   125        135        145        155        165        175
GCAGCAGTGG GGAATATTGC ACAATGGGCG CAAGCCTGAT GCAGCGACGC CGCGTGCGGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   185        195        205        215        225        235
ATGGAGGCCT TCGGGTTGTA AACCGCTTTT GTTCAAGGGC AAGGCACGGT TTCGGCCGTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   245        255        265        275        285        295
TTGAGTGGAT TGTTCGAATA AGCACCGGCT AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   305        315        325        335        345        355
AGGGTGCGAG CGTTATCCGG ATTTATTGGG CGTAAAGGGC TCGTAGGCGG TTCGTCGCGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....
   365        375        385        395
CCGGTGTGAA AGTCCATCGC CTAACGGTGG ACGGTGTAAC GGTG
```

ภาพภาคผนวก ง-13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp. ไอโซเลท H10-01 (ขนาด 404 คู่เบส)

```
 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
     5         15         25         35         45         55
GCGGCATGGG ATGGGGTCGC GTCCTATCAG CTTGTTGGCG GGGTGATGGC CCACCAAGGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    65         75         85         95        105        115
GTTGACGGGT AGCCGGCCTG AGAGGGTGAC CGGCCACATT GGGACTGAGA TACGGCCCAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   125        135        145        155        165        175
ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TGGGGAATAT TGCACAATGG GCGCAAGCCT GATGCAGCGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   185        195        205        215        225        235
CGCCGCGTGC GGGATGGAGG CCTTCGGGTT GTAAACCGCT TTTGTTCAAG GGCAAGGCAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   245        255        265        275        285        295
GGTTTCGGCC GTGTTGAGTG GATTGTTCGA ATAAGCACCG GCTAACTACG TGCCAGCAGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   305        315        325        335        345        355
CGCGGTAATA CGTAGGGTGC GAGCGTTATC CGGATTTATT GGGCGTAAAG GGCTCGTAGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   365        375        385        395        405
CGGTTCGTCG CGTCCGGTGT GAAAGTCCAT CGCCTAACGG TGGATCTGCG
```

ภาพภาคผนวก ง-14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp. ไอโซเลท H10-03 (ขนาด 410 คู่เบส)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
     5         15         25         35         45         55
GGTCGCGTCC TATCAGCTTG TTGGCGGGGT GATGGCCCAC CAAGGCGTTG ACGGGTAGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    65         75         85         95        105        115
GGCCTGAGAG GGTGACCGGC CACATTGGGA CTGAGATACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   125        135        145        155        165        175
CAGCAGTGGG GAATATTGCA CAATGGGCGC AAGCCTGATG CAGCGACGCC GCGTGCGGGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   185        195        205        215        225        235
TGGAGGCCTT CGGGTTGTAA ACCGCTTTTG TTCAAGGGCA AGGCACGGTT TCGGCCGTGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   245        255        265        275        285        295
TGAGTGGATT GTTCGAATAA GCACCGGCTA ACTACGTGCC AGCAGCCGCG GTAATACGTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   305        315        325        335        345        355
GGGTGCGAGC GTTATCCGGA TTTATTGGGC GTAAAGGGCT CGTAGGCGGT TCGTCGCGTC

....|....| ....|....| ....|.
   365        375        385
CGGTGTGAAA GTCCATCGCC TAACGG
```

ภาพภาคผนวก ง-15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp/ ไอโซเลท H10-05 (ขนาด 386 คู่เบส)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
     5         15         25         35         45         55
GGCCCACCAA GGCGTTGACG GGTAGCCGGC CTGAGAGGGT GACCGGCCAC ATTGGGACTG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    65         75         85         95        105        115
AGATACGGCC CAGACTCCTA CGGGAGGCAG CAGTGGGGAA TATTGCACAA TGGGCGCAAG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   125        135        145        155        165        175
CCTGATGCAG CGACGCCGCG TGCGGGATGG AGGCCTTCGG GTTGTAAACC GCTTTTGTTC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   185        195        205        215        225        235
AAGGGCAAGG CACGGTTTCG GCCGTGTTGA GTGGATTGTT CGAATAAGCA CCGGCTAACT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   245        255        265        275        285        295
ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTAGGG TGCGAGCGTT ATCCGGATTT ATTGGGCGTA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   305        315        325        335        345        355
AAGGGCTCGT AGGCGGTTCG TCGCGTCCGG TGTGAAAGTC CATCGCCTAA CGGTGGATCT

....|.
   365
GCGCCG
```

ภาพภาคผนวก ง-16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp. ไอโซเลท P1-P01 (ขนาด 366 คู่เบส)

```
 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    5          15         25         35         45         55
ATGGCCCACC AAGGCGTTGA CGGGTAGCCG GCCTGAGAGG GTGACCGGCC ACATTGGGAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   65         75         85         95        105        115
TGAGATACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATATTGCAC AATGGGCGCA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  125        135        145        155        165        175
AGCCTGATGC AGCGACGCCG CGTGCGGGAT GGAGGCCTTC GGGTTGTAAA CCGCTTTTGT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  185        195        205        215        225        235
TCAAGGGCAA GGCACGGTTT CGGCCGTGTT GAGTGGATTG TTCGAATAAG CACCGGCTAA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  245        255        265        275        285        295
CTACGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGTAG GGTGCGAGCG TTATCCGGAT TTATTGGGCG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  305        315        325        335        345        355
TAAAGGGCTC GTAGGCGGTT CGTCGCGTCC GGTGTGAAAG TCCATCGCCT AACGGTGGAT

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....
  365        375        385        395        405
CTGCGCCGGG TACGGGCGGG CTGGAGTGCG GTAGGGGAGA CTGGAATTCC CGGT
```

ภาพภาคผนวก ง-17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp. ไอโซเลท P4-S01 (ขนาด 414 คู่เบส)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    5          15         25         35         45         55
CGGCATGGGA TGGGGTCGCG TCCTATCAGC TTGTTGGCGG GGTGATGGCC CACCAAGGCG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   65         75         85         95        105        115
TTGACGGGTA GCCGGCCTGA GAGGGTGACC GGCCACATTG GGACTGAGAT ACGGCCCAGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  125        135        145        155        165        175
CTCCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT GCACAATGGG CGCAAGCCTG ATGCAGCGAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  185        195        205        215        225        235
GCCGCGTGCG GGATGGAGGC CTTCGGGTTG TAAACCGCTT TTGTTCAAGG GCAAGGCACG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  245        255        265        275        285        295
GTTTCGGCCG TGTTGAGTGG ATTGTTCGAA TAAGCACCGG CTAACTACGT GCCAGCAGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  305        315        325        335        345        355
GCGGTAATAC GTAGGGTGCG AGCGTTATCC GGATTTATTG GGCGTAAAGG GCTCGTAGGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| .
  365        375        385        395        405
GGTTCGTCGC GTCCGGTGTG AAAGTCCATC GCCTAACGGT GGATCTGCGC C
```

ภาพภาคผนวก ง-18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp. ไอโซเลท P4-S03 (ขนาด 411 คู่เบส)

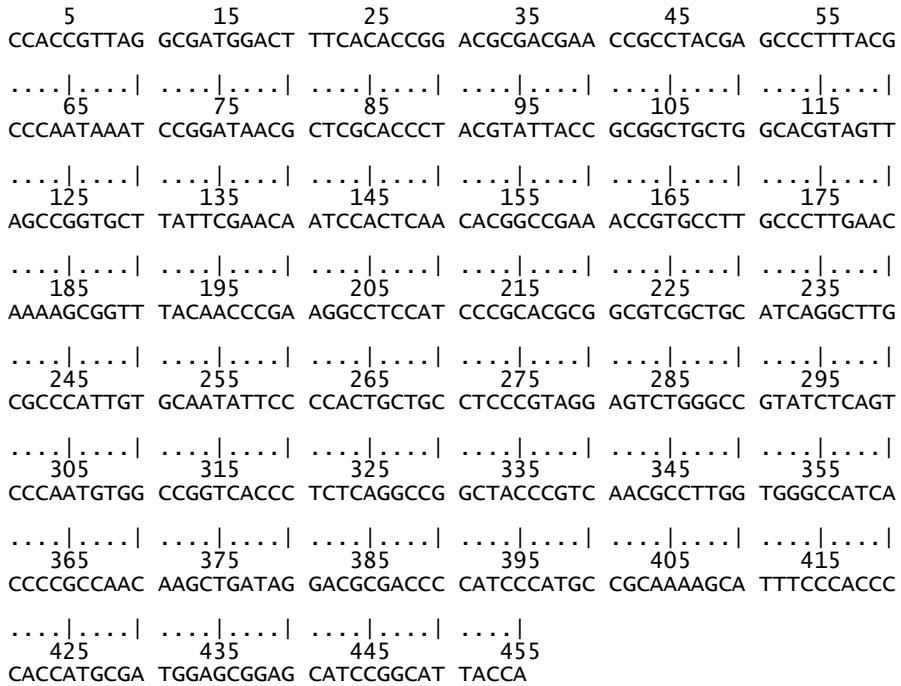
```
 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    5         15         25         35         45         55
CGGCATGGGA TGGGGTCGCG NCCTATCAGT TTGTTGGCGG GGTGATGGCC CACCAAGGCG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   65         75         85         95        105        115
TTGACGGGTA GCCGGCCTGA GAGGGTGACC GGCCACATTG GGACTGAGAT ACGGCCCATA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  125        135        145        155        165        175
CTCCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT GCACAATGGG CGCAAGCCTG ATGCACCGAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  185        195        205        215        225        235
GCCGCGTGCG GGATGGAGGC CTTCGGGTTG TAAACCGCTT TTGTTCAAGG GCAAGGCACG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  245        255        265        275        285        295
GTTTCGGCCG TGTTGAGTGG ATTGTTCGAA TAAGCACCGG CTAACTACGT GCCAGCAGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  305        315        325        335        345        355
GCGGTAATAC GTAGGGTGCG AGCGTTATCC GGATTTATTG GGCGTAAAGG GCTCGTAGGC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ..
  365        375        385        395        405
GGTTCGTCGC GTCCGGTGTG AAAGTCCATC GCCTAACGGT GGATCTGCGC CG
```

ภาพภาคผนวก ง-19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp. ไอโซเลท P8-S01 (ขนาด 412 คู่เบส)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
    5         15         25         35         45         55
CGGCATGGGA TGGGGTCGCG TCCTATCAGC TTGTTGGCGG GGTGATGGCC CACCAAGGCG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
   65         75         85         95        105        115
TTGACGGGTA GCCGGCCTGA GAGGGTGACC GGCCACATTG GGACTGAGAT ACGGCCCAGA

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  125        135        145        155        165        175
CTCCTACGGG AGGCAGCAGT GGGGAATATT GCACAATGGG CGCAAGCCTG ATGCAGCGAC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  185        195        205        215        225        235
GCCGCGTGCG GGATGGAGGC CTTCGGGTTG TAAACCGCTT TTGTTCAAGG GCAAGGCACG

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  245        255        265        275        285        295
GTTTCGGCCG TGTTGAGTGG ATTGTTCGAA TAAGCACCGG CTAACTACGT GCCAGCAGCC

....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
  305        315        325        335        345        355
GCGGTAATAC GTAGGGTGCG AGCGTTATCC GGATTTATTG GGCGTAAAGG GCTCGTAGGC

....|....| ....|....| ....|....| .
  365        375        385
GGTTCGTCGC GTCCGGTGTG AAAGTCCATC G
```

ภาพภาคผนวก ง-20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp. ไอโซเลท P8-S03 (ขนาด 391 คู่เบส)

```
....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
```



ภาพภาคผนวก ง-21 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA ของ *Bifidobacterium* spp. ไอโซเลท P9-P01 (ขนาด 455 คู่เบส)

ภาคผนวก จ

ผลการทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการ

1. ผลการทดสอบความสามารถในการทนกรด (Acid tolerance)

ตารางภาคผนวก จ-1 ผลการทดสอบความสามารถในการทนกรดที่ pH 2 ของ *Bifidobacterium* spp. แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนกรดที่ pH 2									
		0.5 ชั่วโมง		1 ชั่วโมง		2ชั่วโมง		3ชั่วโมง		4 ชั่วโมง	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
H1-05	6.9542	6.9395	99.79	6.9912	100.53	6.9685	100.20	6.9868	100.47	7.0000	100.66
H9-01	6.5798	6.5185	99.07	6.3010	95.76	6.3010	95.76	6.1139	92.92	5.8388	88.74
H9-02	6.9445	6.9031	99.40	6.8062	98.01	6.9542	100.14	6.9395	99.93	6.9542	100.14
H9-03	5.4914	5.3979	98.30	5.3617	97.64	5.2553	95.70	4.9542	90.22	3.3010	60.11
H9-04	7.0414	6.6335	94.21	6.6335	94.21	6.4472	91.56	6.4472	91.56	5.4914	77.99
H9-05	6.8451	6.8388	99.91	6.7853	99.13	6.5185	95.23	6.5798	96.12	5.2304	76.41
H9-06	6.7709	6.7709	100.00	6.7853	100.21	6.7782	100.11	6.7076	99.07	6.5563	96.83
H10-01	5.0000	5.0414	100.83	5.0000	100.00	4.3010	86.02	4.1139	82.28	4.0000	80.00
H10-03	5.3010	5.3222	100.40	5.2553	99.14	5.1461	97.08	4.9590	93.55	3.1761	59.91
H10-05	5.4472	5.3617	98.43	5.4472	100.00	4.8573	89.17	4.7853	87.85	4.4771	82.19

ตารางภาคผนวก จ-1 (ต่อ)

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนกรดที่ pH 2									
		0.5 ชั่วโมง		1 ชั่วโมง		2ชั่วโมง		3ชั่วโมง		4 ชั่วโมง	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
P1-P01	4.7782	4.7404	99.21	3.5441	74.17	3.6021	75.39	3.4624	72.46	3.2788	68.62
P4-S01	5.6021	5.5798	99.60	4.9031	87.52	4.8633	86.81	3.4472	61.53	3.0000	53.55
P4-S03	5.0414	5.1461	102.08	4.9638	98.46	4.4771	88.81	4.4914	89.09	4.6021	91.29
P8-S01	5.3979	5.3979	100.00	5.3802	99.67	5.0000	92.63	4.8062	89.04	4.6990	87.05
P8-S03	5.3010	5.4472	102.76	5.6812	107.17	4.4771	84.46	4.5051	84.99	4.4771	84.46
P9-P01	5.0414	5.1139	101.44	5.0414	100.00	5.0000	99.18	4.6532	92.30	4.0000	79.34
B. animalis subsp. *animalis* ATCC 25527	6.1761	6.1761	100.00	6.2553	101.28	6.1461	99.51	6.0792	98.43	5.9823	96.86

ตารางภาคผนวก จ-2 ผลการทดสอบความสามารถในการทนกรดที่ pH 3 ของ *Bifidobacterium* spp. แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนกรดที่ pH 3									
		0.5 ชั่วโมง		1 ชั่วโมง		2ชั่วโมง		3ชั่วโมง		4 ชั่วโมง	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
H1-05	6.7634	6.7404	99.66	6.7853	100.32	6.7404	99.66	7.0000	103.50	7.0414	104.11
H9-01	6.5441	6.5185	99.61	6.5185	99.61	6.4771	98.98	6.2553	95.59	6.1139	93.43
H9-02	6.9031	6.8976	99.92	6.7993	98.50	6.9031	100.00	6.8751	99.59	6.9085	100.08
H9-03	5.4624	5.3617	98.16	5.3979	98.82	5.1761	94.76	5.0000	91.53	4.6021	84.25
H9-04	7.0000	6.4914	92.73	6.5441	93.49	6.4914	92.73	6.5185	93.12	6.6335	94.76
H9-05	6.8325	6.7853	99.31	6.7782	99.20	6.6812	97.79	6.6812	97.79	6.5441	95.78
H9-06	6.7782	7.4914	110.52	7.1761	105.87	7.1139	104.95	7.1761	105.87	7.1139	104.95
H10-01	5.1761	5.2553	101.53	5.3010	102.41	5.4771	105.82	5.3222	102.82	5.3010	102.41
H10-03	5.3222	5.3424	100.38	5.3222	100.00	5.1139	96.09	5.0000	93.95	4.3010	80.81
H10-05	5.4314	5.3617	98.72	5.3802	99.06	5.4150	99.70	4.9542	91.22	5.0792	93.52

ตารางภาคผนวก จ-2 (ต่อ)

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนกรดที่ pH 3									
		0.5 ชั่วโมง		1 ชั่วโมง		2ชั่วโมง		3ชั่วโมง		4 ชั่วโมง	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
P1-P01	4.7782	4.6990	98.34	4.6990	98.34	4.5798	95.85	4.6232	96.76	4.6990	98.34
P4-S01	5.6128	5.2788	94.05	5.3010	94.45	5.2788	94.05	4.8921	87.16	4.7782	85.13
P4-S03	5.0000	5.1461	102.92	5.1761	103.52	4.8633	97.27	4.8451	96.90	5.1139	102.28
P8-S01	5.4150	5.3979	99.69	5.3222	98.29	5.4150	100.00	5.3617	99.02	5.2553	97.05
P8-S03	5.3222	5.3222	100.00	5.1761	97.25	5.1461	96.69	5.0414	94.72	5.1461	96.69
P9-P01	5.0000	5.3222	106.44	5.1139	102.28	5.0414	100.83	5.1761	103.52	4.3010	86.02
B. animalis subsp. *animalis* ATCC 25527	6.1461	6.0414	98.30	6.1139	99.48	6.1761	100.49	4.3010	69.98	6.2553	101.78

ตารางภาคผนวก จ-3 ผลการทดสอบความสามารถในการทนกรดที่ pH 4 ของ *Bifidobacterium* spp. แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนกรดที่ pH 4									
		0.5 ชั่วโมง		1 ชั่วโมง		2ชั่วโมง		3ชั่วโมง		4 ชั่วโมง	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
H1-05	6.8573	6.8325	99.64	6.7993	99.15	6.7634	98.63	7.1139	103.74	7.0414	102.68
H9-01	6.6021	6.5441	99.12	6.4624	97.88	6.4914	98.32	6.0414	91.51	6.1139	92.61
H9-02	6.9085	6.8325	98.90	6.8513	99.17	6.8388	98.99	6.9031	99.92	6.8751	99.52
H9-03	5.4472	5.3979	99.10	5.3617	98.43	5.3222	97.71	5.2553	96.48	4.9542	90.95
H9-04	7.0792	6.6232	93.56	6.5798	92.95	6.5798	92.95	6.6812	94.38	6.6532	93.98
H9-05	6.8451	6.7709	98.92	6.6435	97.05	6.5315	95.42	6.4771	94.62	6.3979	93.47
H9-06	6.7924	7.5185	110.69	7.3979	108.92	7.2553	106.81	7.1761	105.65	7.1761	105.65
H10-01	5.0000	5.1761	103.52	5.2304	104.61	5.3979	107.96	5.3010	106.02	5.5911	111.82
H10-03	5.3010	5.3222	100.40	5.3010	100.00	5.2553	99.14	5.1761	97.64	4.6021	86.81
H10-05	5.4472	5.4314	99.71	5.3010	97.32	5.3979	99.10	5.3010	97.32	5.3802	98.77

ตารางภาคผนวก จ-3 (ต่อ)

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนกรดที่ pH 4									
		0.5 ชั่วโมง		1 ชั่วโมง		2ชั่วโมง		3ชั่วโมง		4 ชั่วโมง	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
P1-P01	4.7853	4.7634	99.54	4.4771	93.56	4.3010	89.88	4.4914	93.86	4.3979	91.90
P4-S01	5.6021	5.5441	98.96	5.3222	95.00	5.3010	94.63	5.2788	94.23	5.2788	94.23
P4-S03	5.1461	5.3222	103.42	5.0000	97.16	5.0414	97.96	4.9542	96.27	5.1761	100.58
P8-S01	5.3979	5.3010	98.20	5.2553	97.36	5.1461	95.34	5.0414	93.39	5.2041	96.41
P8-S03	5.3617	5.4472	101.59	5.3617	100.00	5.3617	100.00	5.3222	99.26	4.9542	92.40
P9-P01	5.1139	5.2553	102.76	5.0792	99.32	5.1139	100.00	5.1761	101.22	5.0792	99.32
B. animalis subsp. *animalis* ATCC 25527	6.1761	6.3010	102.02	6.2553	101.28	6.1761	100.00	6.1461	99.51	6.2553	101.28

ตารางภาคผนวก จ-4 ผลการทดสอบความสามารถในการทนกรดที่ pH 5 ของ *Bifidobacterium* spp. แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนกรดที่ pH 5									
		0.5 ชั่วโมง		1 ชั่วโมง		2ชั่วโมง		3ชั่วโมง		4 ชั่วโมง	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
H1-05	6.6990	6.9912	104.36	7.0000	104.49	7.0000	104.49	7.1139	106.19	7.0414	105.11
H9-01	6.5911	6.5798	99.83	6.5911	100.00	6.4624	98.05	6.1467	93.26	6.3010	95.60
H9-02	6.9868	6.9085	98.88	6.9445	99.39	6.9638	99.67	6.9494	99.46	6.9777	99.87
H9-03	5.4771	5.4472	99.45	5.3979	98.55	5.3222	97.17	5.3010	96.78	5.2553	95.95
H9-04	7.0414	6.7634	96.05	6.7404	95.72	6.6532	94.49	6.6128	93.91	6.5563	93.11
H9-05	6.8865	6.8388	99.31	6.8451	99.40	6.5051	94.46	6.4914	94.26	6.6532	96.61
H9-06	6.7993	7.7076	113.36	7.3424	107.99	7.3010	107.38	7.3802	108.54	7.3424	107.99
H10-01	5.0000	5.1139	102.28	5.2553	105.11	5.6721	113.44	5.4624	109.25	5.4771	109.54
H10-03	5.3010	5.3010	100.00	5.3617	101.15	5.2553	99.14	5.3222	100.40	5.1761	97.64
H10-05	5.4472	5.3979	99.10	5.4314	99.71	5.3617	98.43	5.3010	97.32	5.4314	99.71

ตารางภาคผนวก จ-4 (ต่อ)

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนกรดที่ pH 5									
		0.5 ชั่วโมง		1 ชั่วโมง		2ชั่วโมง		3ชั่วโมง		4 ชั่วโมง	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
P1-P01	4.7993	4.7782	99.56	4.7634	99.25	4.7634	99.25	4.7853	99.71	4.7404	98.77
P4-S01	5.6335	5.0000	88.76	5.2041	92.38	5.4771	97.22	5.3979	95.82	5.3010	94.10
P4-S03	5.0000	5.0414	100.83	5.0414	100.83	5.1139	102.28	5.1761	103.52	5.0000	100.00
P8-S01	5.4150	5.3802	99.36	5.3979	99.69	5.2788	97.48	5.2788	97.48	5.1139	94.44
P8-S03	5.4150	5.3802	99.36	5.3979	99.69	5.2788	97.48	5.2788	97.48	5.1139	94.44
P9-P01	5.1139	5.0000	97.77	5.3222	104.07	5.0792	99.32	5.1139	100.00	5.0414	98.58
B. animalis subsp. *animalis* ATCC 25527	6.0000	6.1139	101.90	6.1761	102.93	6.2304	103.84	6.3802	106.34	6.2553	104.25

2. ความสามารถในการทนน้ำดี (Bile tolerance)

ตารางภาคผนวก จ-5 ผลการทดสอบความสามารถในการทนน้ำดีที่ 0 เปอร์เซ็นต์ ของ *Bifidobacterium* spp. แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนน้ำดี 0 เปอร์เซ็นต์									
		0.5 ชั่วโมง		1 ชั่วโมง		2 ชั่วโมง		3 ชั่วโมง		4 ชั่วโมง	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
H1-05	7.1761	7.0414	98.12	7.1461	99.58	7.3010	101.74	7.2788	101.43	7.3979	103.09
H9-01	6.2788	6.5798	104.79	6.5441	104.23	6.3617	101.32	6.3802	101.62	6.5563	104.42
H9-02	6.7634	6.6990	99.05	6.5911	97.45	6.6232	97.93	6.5682	97.11	6.5563	96.94
H9-03	5.4771	5.4914	100.26	5.4472	99.45	4.6335	84.60	4.6021	84.02	4.5441	82.96
H9-04	5.6902	5.6021	98.45	5.6335	99.00	5.5911	98.26	5.6128	98.64	5.3010	93.16
H9-05	7.3617	7.3010	99.18	7.3222	99.46	7.2553	98.55	7.3222	99.46	6.8325	92.81
H9-06	7.6128	7.5798	99.57	7.6021	99.86	7.4624	98.02	53.0000	696.20	7.3979	97.18
H10-01	7.1761	7.2553	101.10	7.1461	99.58	7.1761	100.00	7.2304	100.76	7.1461	99.58

ตารางภาคผนวก จ-5 (ต่อ)

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนน้ำดี 0 เปอร์เซ็นต์									
		0.5 ชั่วโมง		1 ชั่วโมง		2 ชั่วโมง		3 ชั่วโมง		4 ชั่วโมง	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
H10-03	5.3010	5.2553	99.14	5.1761	97.64	5.2553	99.14	5.2553	99.14	5.2553	99.14
H10-05	5.1139	5.1139	100.00	5.1761	101.22	5.2553	102.76	5.3010	103.66	5.2788	103.22
P1-P01	4.3010	4.3222	100.49	4.3979	102.25	4.1139	95.65	4.4472	103.40	4.4771	104.09
P4-S01	5.0000	5.1461	102.92	5.2788	105.58	5.3979	107.96	5.3222	106.44	5.4771	109.54
P4-S03	5.4914	5.4771	99.74	5.3979	98.30	5.0414	91.81	5.1461	93.71	4.6990	85.57
P8-S01	5.3010	5.3802	101.49	5.4914	103.59	5.4314	102.46	5.3979	101.83	5.6990	107.51
P8-S03	5.2553	5.2553	100.00	5.3010	100.87	5.1761	98.49	5.2304	99.53	4.7782	90.92
P9-P01	5.3979	5.3010	98.20	5.3222	98.60	5.1461	95.34	5.2788	97.79	5.3010	98.20
B. animalis subsp. *animalis* ATCC 25527	6.4771	6.3424	97.92	6.3979	98.78	6.4472	99.54	6.3617	98.22	6.3010	97.28

ตารางภาคผนวก จ-6 ผลการทดสอบความสามารถในการทนน้ำดีที่ 0.30 เปอร์เซ็นต์ ของ *Bifidobacterium* spp. แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนน้ำดี 0.30 เปอร์เซ็นต์									
		0.5 ชั่วโมง		1 ชั่วโมง		2 ชั่วโมง		3 ชั่วโมง		4 ชั่วโมง	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
H1-05	7.1461	7.0000	97.96	7.0414	98.53	7.1139	99.55	7.1761	100.42	7.3010	102.17
H9-01	6.3010	6.2788	99.65	6.2553	99.27	6.2553	99.27	6.0792	96.48	6.0000	95.22
H9-02	6.6335	6.5911	99.36	6.6021	99.53	6.3979	96.45	6.4914	97.86	6.4472	97.19
H9-03	5.5441	5.4914	99.05	5.4624	98.53	4.1761	75.33	4.0000	72.15	4.0000	72.15
H9-04	5.6902	5.6335	99.00	5.5798	98.06	5.5441	97.43	5.5441	97.43	5.6990	100.15
H9-05	7.3617	6.3010	85.59	6.3222	85.88	6.5563	89.06	6.6232	89.97	6.7482	91.67
H9-06	7.5441	7.6021	100.77	6.8195	90.40	6.7634	89.65	6.7782	89.85	6.7076	88.91
H10-01	7.1461	7.1139	99.55	7.0792	99.06	7.2788	101.86	7.1461	100.00	7.2553	101.53
H10-03	5.3222	5.3617	100.74	5.4472	102.35	4.8451	91.04	4.9590	93.18	5.3617	100.74
H10-05	5.0000	5.0414	100.83	5.0792	101.58	4.6021	92.04	4.5798	91.60	4.8451	96.90

ตารางภาคผนวก จ-6 (ต่อ)

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนน้ำดี 0.30 เปอร์เซ็นต์									
		0.5 ชั่วโมง		1 ชั่วโมง		2 ชั่วโมง		3 ชั่วโมง		4 ชั่วโมง	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
P1-P01	4.3010	4.3222	100.49	4.2553	98.94	4.1761	97.10	4.0414	93.96	4.0000	93.00
P4-S01	5.0414	5.1139	101.44	5.0000	99.18	5.2553	104.24	5.3222	105.57	5.3424	105.97
P4-S03	5.4771	5.4472	99.45	5.3010	96.78	5.0792	92.73	5.0000	91.29	4.5441	82.96
P8-S01	5.3222	5.3222	100.00	5.4771	102.91	5.3010	99.60	5.2041	97.78	5.4314	102.05
P8-S03	5.2553	5.2788	100.45	5.3222	101.27	5.3010	100.87	5.2553	100.00	5.0000	95.14
P9-P01	5.3802	4.8573	90.28	4.8325	89.82	4.8451	90.05	4.7243	87.81	4.5911	85.33
B. animalis subsp. *animalis* ATCC 25527	6.4914	6.3979	98.56	6.4914	100.00	6.3802	98.29	6.3010	97.07	6.3222	97.39

ตารางภาคผนวก จ-7 ผลการทดสอบความสามารถในการทนน้ำดีที่ 1 เปอร์เซ็นต์ ของ *Bifidobacterium* spp. แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนน้ำดี 1 เปอร์เซ็นต์									
		0.5 ชั่วโมง		1 ชั่วโมง		2 ชั่วโมง		3 ชั่วโมง		4 ชั่วโมง	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
H1-05	6.6232	6.4314	97.10	6.5441	98.80	6.3222	95.45	6.1761	93.25	6.2788	94.80
H9-01	6.2553	6.2553	100.00	6.1761	98.73	6.1761	98.73	6.0414	96.58	6.0000	95.92
H9-02	6.5798	6.5911	100.17	6.6128	100.50	6.4624	98.22	6.4914	98.66	6.3979	97.24
H9-03	5.4914	5.3979	98.30	5.3617	97.64	4.0000	72.84	3.6021	65.60	2.4472	44.56
H9-04	5.7076	5.6335	98.70	5.6532	99.05	5.6021	98.15	5.5798	97.76	5.6435	98.88
H9-05	7.3010	6.9912	95.76	6.9542	95.25	6.9494	95.18	6.9638	95.38	6.4771	88.72
H9-06	7.4771	7.6021	101.67	6.8062	91.03	6.7243	89.93	6.7404	90.15	6.5911	88.15
H10-01	7.1761	7.1139	99.13	7.0000	97.55	7.0000	97.55	6.8976	96.12	6.7782	94.45
H10-03	5.3617	5.1761	96.54	5.0000	93.25	5.0414	94.03	5.1139	95.38	4.4771	83.50
H10-05	5.1139	4.4771	87.55	4.3222	84.52	4.0414	79.03	4.0000	78.22	4.0000	78.22

ตารางภาคผนวก จ-7 (ต่อ)

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนน้ำดี 1 เปอร์เซ็นต์									
		0.5 ชั่วโมง		1 ชั่วโมง		2 ชั่วโมง		3 ชั่วโมง		4 ชั่วโมง	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
P1-P01	4.3222	4.3010	99.51	4.0414	93.50	4.0000	92.55	3.7243	86.17	3.3979	78.62
P4-S01	5.0000	5.2788	105.58	5.1761	103.52	5.2788	105.58	5.2553	105.11	5.2553	105.11
P4-S03	5.4914	5.4472	99.20	5.3010	96.53	5.3222	96.92	5.4472	99.20	4.6021	83.81
P8-S01	5.3617	5.1761	96.54	5.8921	109.89	4.6990	87.64	4.6335	86.42	5.2553	98.01
P8-S03	5.2788	5.2788	100.00	5.2788	100.00	5.2553	99.56	5.2553	99.56	4.9031	92.88
P9-P01	5.4771	4.4624	81.47	4.4914	82.00	4.4771	81.74	5.2304	95.50	4.1139	75.11
B. animalis subsp. *animalis* ATCC 25527	6.4472	6.4314	99.76	6.5441	101.50	6.3222	98.06	6.1761	95.80	6.2788	97.39

3. ความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อเมือกผนังลำไส้

ตารางภาคผนวก จ-8 ผลการทดสอบความสามารถในการยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ของ *Bifidobacterium* spp. แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

ลำดับที่	ไอโซเลท	ประสิทธิภาพการยึดเกาะ	
		(%)	ระดับ
1	H1-05	67.83	สูง
2	H9-01	66.94	สูง
3	H9-02	70.15	สูง
4	H9-03	61.19	สูง
5	H9-04	71.46	สูง
6	H9-05	77.08	สูง
7	H9-06	72.23	สูง
8	H10-01	72.90	สูง
9	H10-03	55.74	ปานกลาง
10	H10-05	59.31	ปานกลาง
11	P1-P01	47.29	ปานกลาง
12	P4-S01	29.16	ต่ำ
13	P4-S03	69.84	สูง
14	P8-S01	69.98	สูง
15	P8-S03	61.12	สูง
16	P9-P01	36.42	ต่ำ

หมายเหตุ % การยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ กำหนดโดยใช้เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของ *S.* Enteritidis DMST 15676 (positive control) ซึ่งเป็น positive control และ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 โดยกำหนดได้ ดังนี้ ระดับสูง 60% , ระดับปานกลาง > 40% , ระดับต่ำ < 40%

ตารางภาคผนวก จ-8 (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลท	ประสิทธิภาพการยึดเกาะ	
		(%)	ระดับ
17	*B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527	62.31	สูง
18	*S.* Enteritidis DMST 15676 (positive control)	66.48	สูง
19	*B. subtilis* ATCC 6633 (negative control)	0.00	ต่ำ

หมายเหตุ % การยึดเกาะเยื่อเมือกผนังลำไส้ กำหนดโดยใช้เปอร์เซ็นต์การยึดเกาะของ *S.* Enteritidis DMST 15676 (positive control) ซึ่งเป็น positive control และ *B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527 โดยกำหนดได้ ดังนี้ ระดับสูง 60% , ระดับปานกลาง > 40% , ระดับต่ำ < 40%

4. ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

ตารางภาคผนวก จ-9 ผลการทดสอบความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ของ *Bifidobacterium* spp. แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

ลำดับที่	สายพันธุ์	OD 630 nm		ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (RBGR)	ระดับการเจริญ
		มีออกซิเจน	ไม่มีออกซิเจน		
1	H1-05	0.00±0.00	1.068±0.028	0.00	ไม่เจริญ
2	H9-01	0.00±0.00	1.024±0.018	0.00	ไม่เจริญ
3	H9-02	0.00±0.00	0.956±0.024	0.00	ไม่เจริญ
4	H9-03	0.00±0.00	1.030±0.010	0.00	ไม่เจริญ
5	H9-04	0.00±0.00	1.204±0.004	0.00	ไม่เจริญ
6	H9-05	0.00±0.00	1.118±0.027	0.00	ไม่เจริญ
7	H9-06	0.00±0.00	1.353±0.003	0.00	ไม่เจริญ
8	H10-01	0.00±0.00	1.224±0.006	0.00	ไม่เจริญ
9	H10-03	0.00±0.00	0.829±0.011	0.00	ไม่เจริญ
10	H10-05	0.812±0.001	0.824±0.002	0.985	ดี
11	P1-P01	1.241±0.012	1.217±0.010	1.020	ดี
12	P4-S01	1.144±0.024	1.015±0.023	1.127	ดี

หมายเหตุ 1. RBGR = relative bacteria growth ratio

2. ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน; อัตราส่วนของค่า RBGR

RBGR > 0.9 หมายความว่า แบคทีเรียเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน

RBGR > 0.5-0.9 หมายความว่า แบคทีเรียเจริญได้ปานกลางในสภาวะที่มีออกซิเจน

RBGR < 0.1-0.5 หมายความว่า แบคทีเรียสามารถเจริญได้น้อยในสภาวะที่มีออกซิเจน

RBGR = 0 หมายความว่า แบคทีเรียไม่สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน

(ดัดแปลงจาก Maxwell et al., 2004)

ตารางภาคผนวก จ-9 (ต่อ)

ลำดับที่	สายพันธุ์	OD 630 nm		ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (RBGR)	ระดับการเจริญ
		มีออกซิเจน	ไม่มีออกซิเจน		
13	P4-S03	1.212±0.009	1.080±0.044	1.122	ดี
14	P8-S01	0.781±0.100	1.055±0.001	0.741	ปานกลาง
15	P8-S03	1.181±0.077	1.119±0.003	1.055	ดี
16	P9-P01	0.854±0.005	1.015±0.006	0.841	ปานกลาง
17	*B. animalis* subsp. *animalis* ATCC 25527	0.00±0.00	0.743±0.034	0.00	ไม่เจริญ

หมายเหตุ 1. RBGR = relative bacteria growth ratio

2. ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน; อัตราส่วนของค่า RBGR

RBGR > 0.9 หมายความว่า แบคทีเรียเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน

RBGR > 0.5-0.9 หมายความว่า แบคทีเรียเจริญได้ปานกลางในสภาวะที่มีออกซิเจน

RBGR < 0.1-0.5 หมายความว่า แบคทีเรียสามารถเจริญได้น้อยในสภาวะที่มีออกซิเจน

RBGR = 0 หมายความว่า แบคทีเรียไม่สามารถเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน

(ดัดแปลงจาก Maxwell et al., 2004)

5. ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง (Heat tolerance)

ตารางภาคผนวก จ-10 ผลการทดสอบความสามารถในการทนอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส ของ *Bifidobacterium* spp. แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงที่ 42 องศาเซลเซียส							
		5 นาที		10 นาที		30 นาที		60 นาที	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
H1-05	6.5051	6.4771	99.57	6.5441	100.60	6.5441	100.60	6.5682	100.97
H9-01	6.1461	6.1761	100.49	6.2553	101.78	5.6990	92.72	5.7160	93.00
H9-02	6.4771	6.7634	104.42	6.8325	105.49	6.7782	104.65	5.8129	89.75
H9-03	6.9031	6.8921	99.84	6.8388	99.07	6.8451	99.16	6.8325	98.98
H9-04	7.0000	7.4771	106.82	7.9494	113.56	7.8921	112.74	7.9031	112.90
H9-05	6.8751	6.8633	99.83	6.8388	99.47	6.8388	99.47	4.6990	68.35
H9-06	7.1461	7.5798	106.07	7.9294	110.96	7.8751	110.20	7.8921	110.44
H10-01	5.3010	5.2553	99.14	5.3617	101.15	5.3010	100.00	5.5563	104.82

ตารางภาคผนวก จ-10 (ต่อ)

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงที่ 42 องศาเซลเซียส							
		5 นาที		10 นาที		30 นาที		60 นาที	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
H10-03	4.6990	4.6812	99.62	4.7076	100.18	4.5911	97.70	4.6335	98.61
H10-05	5.6021	5.5051	98.27	5.1461	91.86	5.3222	95.00	5.9031	105.37
P1-P01	4.4472	4.1139	92.51	4.2304	95.13	4.2553	95.69	4.0414	90.88
P4-S01	5.0792	5.1761	101.91	5.3010	104.37	5.0414	99.26	4.9542	97.54
P4-S03	5.3424	5.3222	99.62	5.3010	99.23	5.3222	99.62	5.4472	101.96
P8-S01	5.1461	5.1139	99.37	5.1761	100.58	5.3222	103.42	5.3222	103.42
P8-S03	5.1461	5.2788	102.58	5.3617	104.19	5.3222	103.42	5.3802	104.55
P9-P01	5.9777	5.9542	99.61	5.8751	98.28	5.7782	96.66	4.8573	81.26
B. animalis subsp. *animalis* ATCC 25527	6.4472	6.4771	100.46	6.3979	99.24	6.9138	107.24	6.3979	99.24

ตารางภาคผนวก จ-11 ผลการทดสอบความสามารถในการทนอุณหภูมิที่ 52 องศาเซลเซียส ของ *Bifidobacterium* spp. แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

ไอโซเลท	**ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)**	**ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงที่ 52 องศาเซลเซียส**							
		5 นาที		**10 นาที**		**30 นาที**		**60 นาที**	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
H1-05	6.4914	6.4771	99.78	6.1761	95.14	5.9542	91.73	4.7076	72.52
H9-01	6.1761	6.1139	98.99	6.1761	100.00	5.6335	91.21	4.3979	71.21
H9-02	6.4914	6.6021	101.71	6.3222	97.39	5.7243	88.18	4.6128	71.06
H9-03	6.8976	6.8325	99.06	6.6990	97.12	5.4771	79.41	4.2553	61.69
H9-04	7.0414	7.4914	106.39	6.4472	91.56	6.3979	90.86	6.0414	85.80
H9-05	6.7993	6.7853	99.79	6.7076	98.65	5.4472	80.11	4.4771	65.85
H9-06	7.1139	7.1461	100.45	6.8751	96.64	5.2041	73.15	4.9243	69.22
H10-01	5.3222	5.0000	93.95	5.5563	104.40	4.7634	89.50	4.2304	79.49
H10-03	4.6990	4.5911	97.70	4.3979	93.59	4.3802	93.22	3.6021	76.66
H10-05	5.5911	6.0000	107.31	5.8865	105.28	4.8865	87.40	4.8388	86.55

ตารางภาคผนวก จ-11 (ต่อ)

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงที่ 52 องศาเซลเซียส							
		5 นาที		10 นาที		30 นาที		60 นาที	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
P1-P01	4.2553	4.0000	94.00	3.4771	81.71	2.6990	63.43	1.6990	39.93
P4-S01	5.0000	5.3222	106.44	5.1461	102.92	5.0000	100.00	4.8573	97.15
P4-S03	5.3424	5.3010	99.23	5.0792	95.07	5.0000	93.59	4.7853	89.57
P8-S01	5.1761	5.2553	101.53	5.3010	102.41	5.1761	100.00	5.1139	98.80
P8-S03	5.1139	5.1461	100.63	5.2041	101.76	5.1461	100.63	5.1761	101.22
P9-P01	5.9542	4.6990	78.92	4.1461	69.63	2.0000	33.59	1.0000	16.79
B. animalis subsp. *animalis* ATCC 25527	6.4771	6.4472	99.54	6.0414	93.27	4.8633	75.08	3.7243	57.50

ตารางภาคผนวก จ-12 ผลการทดสอบความสามารถในการทนอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส ของ *Bifidobacterium* spp. แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

ไอโซเลท	**ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)**	**ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงที่ 55 องศาเซลเซียส**							
		5 นาที		**10 นาที**		**30 นาที**		**60 นาที**	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
H1-05	6.4771	6.4472	99.54	5.8692	90.61	3.2788	50.62	2.3010	35.53
H9-01	6.1461	6.0792	98.91	5.0414	82.03	3.6128	58.78	2.3222	37.78
H9-02	6.5441	6.4914	99.19	6.4472	98.52	3.2788	50.10	2.0414	31.19
H9-03	6.9031	6.6232	95.95	5.7404	83.16	3.5185	50.97	2.0000	28.97
H9-04	7.1139	7.3979	103.99	6.8633	96.48	2.1139	29.72	0.0000	0.00
H9-05	6.8451	6.7782	99.02	6.6128	96.61	3.5682	52.13	2.6812	39.17
H9-06	7.0000	7.0414	100.59	6.7993	97.13	2.0000	28.57	0.0000	0.00
H10-01	5.3010	5.5315	104.35	4.9031	92.49	4.9494	93.37	4.8751	91.96
H10-03	4.7076	4.4771	95.10	4.4914	95.41	3.9031	82.91	2.0000	42.48
H10-05	5.6021	5.3979	96.36	4.8451	86.49	3.6532	65.21	3.3222	59.30

ตารางภาคผนวก จ-12 (ต่อ)

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงที่ 55 องศาเซลเซียส							
		5 นาที		10 นาที		30 นาที		60 นาที	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
P1-P01	4.3010	3.0000	69.75	2.3010	53.50	1.0000	23.25	0.0000	0.00
P4-S01	5.1139	4.9243	96.29	4.8129	94.11	3.4771	67.99	3.2041	62.65
P4-S03	5.3222	4.6128	86.67	3.3010	62.02	3.1761	59.68	2.4472	45.98
P8-S01	5.1461	5.1139	99.37	5.0000	97.16	4.9191	95.59	3.3222	64.56
P8-S03	5.1461	4.8633	94.50	3.5798	69.56	3.3979	66.03	2.6335	51.17
P9-P01	5.9494	3.3617	56.51	1.0000	16.81	1.0000	16.81	0.0000	0.00
B. animalis subsp. *animalis* ATCC 25527	6.3802	5.3010	83.09	5.8751	92.08	3.5441	55.55	3.3802	52.98

ตารางภาคผนวก จ-13 ผลการทดสอบความสามารถในการทนอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส ของ *Bifidobacterium* spp. แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากสุกรและอุจจาระเด็กทารก

ไอโซเลท	**ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)**	**ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงที่ 60 องศาเซลเซียส**							
		5 นาที		**10 นาที**		**30 นาที**		**60 นาที**	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
H1-05	6.5441	6.4771	98.98	4.0000	61.12	2.2041	33.68	2.5051	38.28
H9-01	6.2304	6.0414	96.97	5.1461	82.60	2.6021	41.76	1.0000	16.05
H9-02	6.6990	6.6335	99.02	5.6721	84.67	5.6021	83.63	2.6128	39.00
H9-03	6.8976	4.0414	58.59	2.6990	39.13	0.0000	0.00	0.0000	0.00
H9-04	7.1139	7.3979	103.99	6.0792	85.45	5.6021	78.75	5.1139	71.89
H9-05	6.8573	4.6021	67.11	3.0414	44.35	0.0000	0.00	0.0000	0.00
H9-06	7.1139	5.5911	78.59	2.2788	32.03	2.1139	29.72	2.0000	28.11
H10-01	5.3617	4.2041	78.41	3.5563	66.33	0.0000	0.00	0.0000	0.00
H10-03	4.6812	3.0000	64.09	2.3010	49.15	0.0000	0.00	0.0000	0.00
H10-05	5.5441	2.0000	36.07	1.7782	32.07	0.0000	0.00	0.0000	0.00

ตารางภาคผนวก จ-13 (ต่อ)

ไอโซเลท	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (cfu/ml)	ความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงที่ 60 องศาเซลเซียส							
		5 นาที		10 นาที		30 นาที		60 นาที	
		ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต	ปริมาณเชื้อที่รอดชีวิต (cfu/ml)	% การรอดชีวิต
P1-P01	4.3979	2.0000	45.48	1.0000	22.74	0.0000	0.00	0.0000	0.00
P4-S01	5.0792	4.6532	91.61	4.6021	90.61	3.3010	64.99	3.4771	68.46
P4-S03	5.3010	4.5441	85.72	3.1761	59.91	3.0792	58.09	3.2553	61.41
P8-S01	5.1461	5.1139	99.37	4.9542	96.27	4.9085	95.38	3.1139	60.51
P8-S03	5.0792	4.9345	97.15	3.7076	73.00	3.5051	69.01	3.0792	60.62
P9-P01	5.9494	3.7782	63.50	1.0000	16.81	1.0000	16.81	0.0000	0.00
B. animalis subsp. *animalis* ATCC 25527	6.3979	4.3617	68.17	3.8195	59.70	1.0000	15.63	0.0000	0.00

6. การศึกษาความไวต่อยาต้านจุลชีพ

ตารางภาคผนวก จ-14 Breakpoints ของยาต้านจุลชีพแต่ละชนิดสำหรับการพิจารณาความไวของแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพ (CLSI, 2007)

ยาต้านจุลชีพ	ความเข้มข้นของยา	แบคทีเรียทดสอบ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (mm)		
			R	I	S
Amoxycillin (AML)	10 µg	*Staphylococcus* spp.	≤ 19	-	≥ 20
	10 µg	*Heamophilus* spp.	≤ 19	-	≥ 20
Erythromycin (E)	15 µg	*Staphylococcus* spp.	≤ 13	14-22	≥ 23
	15 µg	*Enterococcus* spp.	≤ 13	14-22	≥ 23
	15 µg	*S. pneumoniae*	≤ 13	14-22	≥ 23
Sulphamethoxazole (STX)	23.75 µg	*Acinetobacter* spp.	≤ 10	11-15	≥ 16
	23.75 µg	Enterobacteriaceae	≤ 10	11-15	≥ 16
	23.75 µg	*Streptococcus* spp.	≤ 10	11-15	≥ 16
Fosfomycin (FOS)	200 µg	*Enterococcus* spp.	≤ 14	15-18	≥ 19
	200 µg	Enterobacteriaceae	≤ 12	13-15	≥ 16
Colistin sulphate (CT)	10 µg	*Ps. aeruginosa*	≤ 10	-	≥ 11
Gentamicin (CN)	10 µg	Enterobacteriaceae	≤ 12	13-14	≥ 15
	10 µg	*Ps. aeruginosa*	≤ 12	13-14	≥ 15
	10 µg	*Acinetobacter* spp.	≤ 12	13-14	≥ 15
	10 µg	*Staphylococcus* spp.	≤ 12	13-14	≥ 15
Doxycyclin (DO)	30 µg	*Staphylococcus* spp.	≤ 12	13-15	≥ 16
	30 µg	*Enterococcus* spp.	≤ 12	13-15	≥ 16
Oxytetracycline (OT)	30 µg	Enterobacteriaceae	≤ 11	12-14	≥ 15
	30 µg	*Acinetobacter* spp.	≤ 11	12-14	≥ 15

หมายเหตุ R หมายถึง Resistant , I หมายถึง Intermediate , S หมายถึง Sensitive