รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตผลเกษตร

2. โครงการวิจัย : การลดการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์

กิจกรรมที่ 2 : การใช้ประโยชน์จากเชื้อราและแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษ

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : ศึกษาชนิดของ Lactic Acid Bacteria (LAB) ในการควบคุมเชื้อรา *Aspergillus* sp.

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ): Study of Lactic Acid Bacteria for Controlling *Aspergillus* sp.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวสุพี วนศิรากุล สังกัด กวป.

ผู้ร่วมงาน : นางสาวศุภรา อัคคะสาระกุล สังกัด กวป.

นางสาวเนตรา สมบูรณ์แก้ว สังกัด กวป.

5. บทคัดย่อ

การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกในการควบคุมเชื้อรา *Aspergillus flavus* จากตัวอย่างอาหารประเภทหมักดองจำนวน 20 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 84 ไอโซเลท พบแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* (A.39) จำนวน 36 ไอโซเลท คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา ด้วยวิธี dual culture overlay assay ได้จำนวน 10 ไอโซเลท ซึ่งมีกิจกรรมยับยั้ง 4.99-7.94% ของพื้นที่ จัดจำแนกชนิดแบคทีเรียด้วยชุดตรวจสอบ API 50 CHL พบว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus plantarum1* (LS603, LS901), *L. plantarum2* (LS1802), *L. pentosus* (LS704, LS1701, LS1702, LS1703, LS1704, LS1709) และ *L. salivarius* (LS604) นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้สารละลายเซลล์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ในอาหาร PDA ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 12.51-18.54% โดย *L. pentosus* LS1704, LS1709, LS1701 และ *L. plantarum1* LS603 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงสุด 18.54, 18.15, 17.42 และ 17.05% ตามลำดับ และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ในอาหาร PDA+MRS ได้ 100% การใช้สารละลายปราศจากเซลล์พบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา 0.75-7.27% พบการเจริญไม่แตกต่างกับชุดควบคุม ส่วนการทดสอบการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี 1 พบว่า เซลล์แบคทีเรียสามารถยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี1 ได้ 9.77-19.52% และการใช้สารละลายปราศจากเซลล์สามารถยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี1 ได้ 5.46-9.62% จากผลการทดลองสามารถนำแบคทีเรียกรดแลคติกไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* ในผลิตผลทางการเกษตรได้โดยจะเป็นทางเลือกที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

คำหลัก: แบคทีเรียกรดแลคติก อาหารหมักดอง การยับยั้งการเจริยของเชื้อรา การยับยั้งสารอะฟลาทอกซิน บี1

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Study on Lactic Acid Bacteria (LAB) to controlling *Aspergillus flavus*. A total of 84 LAB were isolated from 20 samples of fermented foods. Thirty six isolates were found to inhibit *A. flavus* (A.39). The 10 isolates have highly effective for inhibition *A. flavus* were obtained by dual culture overlay assay, the inhibitory activities for 4.99-7.94% of the area. The species of bacteria were identified as *Lactobacillus plantarum1* (LS603, LS901), *L. plantarum2* (LS1802), *L. pentosus* (LS704, LS1701, LS1702, LS1703, LS1704, LS1709) and *L. salivarius* (LS604) by API 50 CHL Test Kit. In addition, it was found that the cell suspension were inhibited the growth of *A. flavus* (A.39) in PDA medium for 12.51-18.54%. *L. pentosus* LS1704, LS1709, LS1701 and *L. plantarum1* LS603 were able to inhibited the growth of fungi at 18.54, 18.15, 17.42 and 17.05%, respectively. And they were able to inhibit the fungal growth at 100% in PDA+MRS medium. The cell free supernatant from LAB slightly reduced fungal growth for 0.75-7.27%. While cell suspension and cell free supernatant of LAB showed inhibit aflatoxin B_1 production for 9.77-19.52% and 5.46-9.62%, respectively.

Keywords: Lactic Acid Bacteria (LAB), fermented foods, inhibition of fungal growth, inhibition of aflatoxin B_1

6. คำนำ

การปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อรา (Mycotoxins) เป็นปัญหาที่พบในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวหลายชนิด ส่งผลกระทบทั้งในแง่เศรษฐกิจ และความปลอดภัยต่อสุขภาพผู้บริโภค เชื้อรานอกจากจะทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารแล้ว บางชนิดยังสามารถสร้างสารพิษซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งที่สำคัญด้วย เชื้อราที่สร้างสารพิษพบหลายกลุ่มด้วยกัน เช่น รา *Aspergillus* พบสร้างสารอะฟลาทอกซินและโอคราทอกซิน รา *Fusarium* พบสร้างสารพิษฟูโมนิซิน เป็นต้น การจัดการเพื่อลดความเสี่ยงในการบริโภคผลิตผลเกษตรที่มีการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง (กรมวิชาการเกษตร, 2560)

ปัจจุบันมีการศึกษาการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและยับยั้งการสร้างสารพิษจากเชื้อราหลายวิธีด้วยกัน ทั้งกระบวนการทางเคมี เช่น การใช้โซเดียมไฮเปอร์คลอไรท์ (sodium hypochlorite) การใช้โอโซน กระบวนการทางกายภาพ เช่น การคัดแยกเมล็ด การใช้ความร้อน การใช้แสงอุลตร้าไวโอเลต หรือการใช้รังสี แต่วิธีดังกล่าว ก็ยังไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ มีค่าใช้จ่ายสูง อีกทั้งทำให้เกิดความสูญเสียทางโภชนาการกับผลิตผลเกษตรและผลิตภัณฑ์ด้วย (Line and Brackett, 1995) การใช้กระบวนการทางชีวภาพ โดยการนำจุลินทรีย์มาใช้เป็นวิธีที่นำมาใช้ในการควบคุมเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์ เช่น การใช้แบคทีเรีย ยีสต์ หรือเชื้อรา เนื่องจากพบได้ในธรรมชาติ ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภค

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ทนต่อความเป็นกรด ต้องการอาหารสูงในการเจริญเติบโต และผลิตกรดแลคติคเป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยการหมัก

กรมวิชาการเกษตร

น้ำตาลแล้วเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก พบได้ในอาหารหมักดองหลายชนิด ผลิตภัณฑ์หมักดอง เช่น ปลาร้า ปลาส้ม แหนม ขนมจีน ผักและผลไม้ดอง ผลิตภัณฑ์นม เช่น เนยแข็ง นมเปรี้ยว หรือโยเกิร์ต เป็นต้น กระบวนการหมักที่มีการผลิตกรดแลคติคจะให้กลิ่นรสและเนื้อสัมผัสที่หลากหลาย มีการนำเอาแบคทีเรียแลคติกหลายชนิดมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เป็นการถนอมอาหาร ทำให้อาหารเก็บได้นานและปลอดภัยเมื่อนำไปบริโภค เนื่องจากกรดที่ได้จากการหมักทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารลดลง ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น แบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักผักและผลไม้ดอง 3 สกุลหลักๆ ได้แก่ *Lactobacillus, Leuconostoc* และ *Pediococcus* โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีส่วนช่วยในกระบวนการหมักดองที่สำคัญ เช่น *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides* และ *Pediococcus pentosaceus* นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังจัดเป็นโปรไบโอติก (probiotics) ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ของมนุษย์ ทำให้เกิดสมดุลย์ของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค รวมทั้งกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Yeung and Laquata, 2003) สารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติก ได้แก่ กรดอินทรีย์ (organic acid) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ไดอะซิทิล (diacetyl) ริวเทอรีน (reuterin) และแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) (ภักดี, 2548) แบคทีเรียกลุ่มนี้ เช่น *Lactobacillus* และ *Lactococcus* สามารถสร้างสารปฏิชีวนะออกมาทำลายเชื้อโรคพืชบางชนิด เช่น เชื้อรา *Aspergillus* sp. และ *Fusarium* sp. ได้

Haskard *et al*., (2001) รายงานว่า โครงสร้างของแบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถในการจับกับสารอะฟลาทอกซิน บี1 (AFB_1) ทำให้มีการคัดแยกความหลากหลายสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งที่มาต่างๆ เช่น โยเกิร์ต ขนมปัง ธัญพืช และอาหารหมักดอง เพื่อศึกษาถึงความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการจับกับ AFB_1 และทำให้สามารถลดปริมาณของ AFB_1 ได้มากน้อยแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ มีการทดสอบนำแบคทีเรียกรด แลคติก 8 สายพันธุ์ มาจับกับ AFB_1 พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก ทั้ง 8 สายพันธุ์ สามารถจับกับ AFB_1 ได้ (Hernandez-Mendoza *et al*., 2009) นอกจากนี้ ยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus* และยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน (Khanafari *et al*, 2007) การนำแบคทีเรียในกลุ่มนี้มาใช้ในการยับยั้งเชื้อราในผลิตผลเกษตรจะช่วยลดความเสี่ยงในการได้รับเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราลงได้ เป็นวิธีการควบคุมทางชีวภาพที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ: De Man Rogosa and Sharpe (MRS), Potato Dextrose Agar (PDA)
2. ชุดทดสอบสารอะฟลาทอกซินสำเร็จรูป DOA –Aflatoxin ELISA test kit
3. ชุดทดสอบชนิดแบคทีเรีย API 50 CHL
4. คิวเวตพลาสติก (cuvette)
5. syringe filter

ศูนย์วิทยทรัพยากร

6. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Eppendorf รุ่น New Brunswick Innova® 42

7. เครื่อง spectrophotometer ยี่ห้อ Thermo scientific รุ่น evolution 201

8. เครื่องปั่นเหวี่ยง ยี่ห้อ Tomy รุ่น MX-307

วิธีการ

1. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) จากผลิตภัณฑ์อาหาร

เก็บตัวอย่างอาหารประเภทหมักดอง ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกโดยเจือจางน้ำที่ได้จากตัวอย่างลงครั้งละ 10 เท่า นำตัวอย่างที่เจือจางระดับ 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง De Man Rogosa and Sharpe (MRS) ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5% บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เลือกเก็บโคโลนีเดี่ยวที่มีบริเวณใสรอบๆ ลงบนอาหาร MRS

2. ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

2.1 การเตรียมสารละลายสปอร์ (spore suspension) ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* (A39)

เลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* (A39) ในอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน นำสปอร์ไปละลายในน้ำกลั่นผสม tween 20 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นับสปอร์ให้มีจำนวนสปอร์ประมาณ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสารละลายแบคทีเรีย

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วแตะเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.1 แบ่งอาหารเหลวที่มีเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญ ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทน้ำทิ้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จะได้สารละลายเซลล์แบคทีเรีย (cell suspension) ปรับให้มีปริมาณ $1.5x10^8$ CFU โดยปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standard

2.2.2 แบ่งอาหารเหลวที่มีเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญ ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 5 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อัตรา 9,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำส่วนใสกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร จะได้สารละลายปราศจากเซลล์ (cell free supernatant, CFS)

2.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี Dual culture overlay assay ดัดแปลงวิธีการของ Magnusson and Schürer (2001)

หยดสารละลายเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จำนวน 2 จุด ห่างกัน 3 เซนติเมตร ลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วหยดสารละลายสปอร์เชื้อรา *A. flavus* (A39) ที่เตรียมได้ในข้อ 2.1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในอาหารกึ่งแข็ง potato dextrose agar (PDA) เททับลงบนอาหาร MRS บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 วัน สังเกตจากบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดรอบเชื้อแบคทีเรีย วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อแบคทีเรียและ

กรมวิชาการเกษตร

บริเวณใสรอบเชื้อ คำนวณกิจกรรมการยับยั้ง (inhibitory activity) จากอัตราส่วนของพื้นที่บริเวณยับยั้งต่อพื้นที่การเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง} = \frac{\text{พื้นที่ของบริเวณยับยั้ง}}{\text{พื้นที่การเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก}}$$

โดยกำหนดให้ (-) ไม่พบบริเวณยับยั้ง, (+) กิจกรรมยับยั้ง 0.1-3.0%, (++) กิจกรรมยับยั้ง 3.1-8.0% และ (+++) กิจกรรมยับยั้งมากกว่า 8.0%

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* (A39)

2.4.1 นำสารละลายเซลล์แบคทีเรีย (cell suspension) ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สำหรับอาหาร PDA และ 10 ไมโครลิตร สำหรับอาหาร PDA+MRS หยดลงในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และ PDA+MRS ตามลงไป หมุนวนจานเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สารกระจายทั่ว เมื่ออาหารแข็งหยดสารละลายสปอร์ ของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ที่ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับจานควบคุมหรือจานเลี้ยงเชื้อที่หยดน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราในจานทดสอบและจานควบคุม คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

2.4.2 นำส่วนใสหรือสารละลายปราศจากเซลล์ (cell free supernatant) ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หยดลงในจานเลี้ยงเชื้อ แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตามลงไปหมุนวนจานเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สารกระจายทั่ว เมื่ออาหารแข็งหยดสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ที่ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตรงกลางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เปรียบเทียบกับจานควบคุมที่เติมอาหารเหลว MRS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราในจานทดสอบและจานควบคุม คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

$$\text{เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา} = (D1-D2) / D1 \times 100$$

โดย D1 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในจานควบคุม

D2 = เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราในจานทดสอบ

3. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างสารพิษของแบคทีเรียกรดแลคติก

นำเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* (A39) ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี1 ของเชื้อรา *A. flavus* (A39) โดยนำเชื้อราจากการทดลองข้อ 2.4 ที่อายุ 10 วัน ตัดชิ้นวุ้นของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 6 ชิ้น ใส่ลงหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 2 มิลลิลิตร นำมาสกัดสารอะฟลาทอกซิน บี1 ดัดแปลงจากวิธีของ Teniola *et al.* (2005) โดยเติมคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีชิ้นวุ้นของเชื้อรา เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 60 นาที ดูดน้ำส่วนใส ผ่าน syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ใสในหลอดใหม่ ระเหยแห้งโดยใช้ก๊าซไนโตรเจน จากนั้นเติมเมทานอล 70% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำ

กรมวิชาการเกษตร

สารสกัดที่ได้ไปตรวจสอบสารอะฟลาทอกซิน บี1 ด้วยชุดทดสอบ DOA ELISA Test Kit คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ดังนี้

เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* = (C-T) / C x 100

โดย C = ปริมาณสารอะฟลาทอกซิน บี1 จากเชื้อราที่ได้จากชุดควบคุม

T = ปริมาณสารอะฟลาทอกซิน บี จากเชื้อราที่ได้จากการทดสอบ Dual culture overlay assay

4. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

จำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยการทดสอบสมบัติทางชีวเคมี ใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL (Biomerieux, France) ทดสอบโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเพื่อเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียให้มีความเข้มข้นสูง หยดสารละลายเชื้อที่เตรียมได้ใส่ในหลอดที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ให้มีความขุ่นเท่ากับ 2 McFarland บันทึกจำนวนหยดของสารละลายแบคทีเรียเข้มข้นที่ใช้ (n) เติมสารละลายแบคทีเรียเข้มข้นลงในอาหาร API 50 CHL ปริมาตร 2n ใส่เชื้อที่เตรียมจากอาหาร API 50 CHL ลงในช่องทดสอบ API 50 CH บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C ระยะเวลา 48 ชม. บันทึกผล ดังนี้ (+) เมื่ออาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง, (-) เมื่ออาหารไม่เปลี่ยนสี และ (?) เมื่อให้ผลไม่ชัดเจน จำแนกชนิดด้วยโปรแกรม apiweb™

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาทำการทดลอง: ตุลาคม 2561– กันยายน 2563

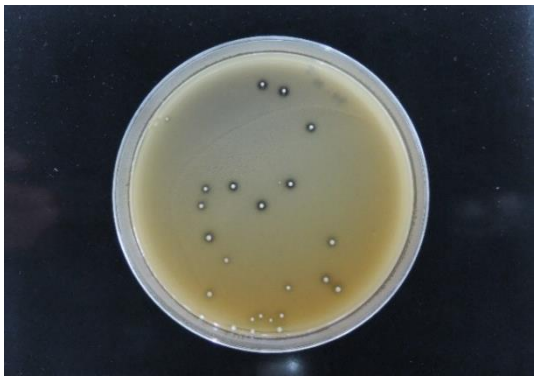
สถานที่ทำการทดลอง: ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวพืชไร่ กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) จากผลิตภัณฑ์อาหาร

เก็บตัวอย่างอาหารจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ ผักกาดดอง หน่อไม้ดอง อุ่นดอง นมเปรี้ยว โยเกิร์ต ผักเสี้ยนดอง ผักดอง กิมจิ น้ำสลัด ขิงดอง ขนมจีน และข้าวหมาก รวมทั้งหมด 20 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) โดยคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกโคโลนีเดี่ยวที่มีบริเวณใสรอบๆ บนอาหาร MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5% (ภาพที่ 1) ได้จำนวน 84 ไอโซเลต ซึ่งกรดแลคติคที่แบคทีเรียสร้างขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคาร์บอเนตจะได้แคลเซียมแลคเตทที่ละลายน้ำได้ โดยมีลักษณะเป็นวงใสที่ชัดเจนรอบๆ แบคทีเรีย (Wulandari *et al*, 2020)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 1 ลักษณะวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบๆ แบคทีเรียบนอาหารแข็ง MRS

ตารางที่ 1 จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในอาหารหมักดองชนิดต่างๆ

ชนิดอาหาร	จำนวน (ตัวอย่าง)	จำนวนเชื้อ LAB (ไอโซเลท)
1. ผักกาดดอง	2	8
2. หน่อไม้ดอง	3	19
3. องุ่นดอง	1	0
4. นมเปรี้ยว	1	3
5. โยเกิร์ต	3	5
6. ผักเสี้ยนดอง	2	10
7. ผักดอง	2	18
8. กิมจิ	1	3
9. น้ำสลัด	1	1
10. ขิงดอง	1	0
11. ขนมจีน	2	8
12. ข้าวหมาก	1	9
รวม	20	84

กรมวิชาการเกษตร

2. ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

ทดสอบความสามารถการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* (A39) ด้วยวิธี Dual culture overlay assay ดัดแปลงวิธีการของ Magnusson and Schürer (2001) พบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อราจำนวน 36 ไอโซเลท (ตารางที่ 2) โดยคำนวณกิจกรรมการยับยั้งจากอัตราส่วนของพื้นที่บริเวณยับยั้งต่อพื้นที่การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราจะเกิดบริเวณยับยั้งที่ชัดเจน (ภาพที่ 2) ซึ่งแบคทีเรียอาจสร้างสารบางชนิด เช่น กรดแลคติค กรดอะซิติก ที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อราได้ หรือเกิดจากการ

แข่งขันกันในการใช้สารอาหารและการใช้พื้นที่ในการเจริญ ตามกลไกการยับยั้งในลักษณะการแข่งขัน (competition)

ภาพที่ 2 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* (A39) (ก) ไม่พบบริเวณยับยั้ง (-), (ข) กิจกรรมยับยั้ง 0.1-3.0% (+), (ค) กิจกรรมยับยั้ง 3.1-8.0%

ตารางที่ 2 กิจกรรมการยับยั้ง (inhibition activity) เชื้อรา *A. flavus* (A39) ของแบคทีเรียกรดแลคติก

isolate	Inhibition activity	isolate	Inhibition activity	isolate	Inhibition activity
LS504	+	LS1003	+	LS1704	++
LS602	+	LS1004	+	LS1705	+
LS603	++	LS1006	+	LS1706	+
LS604	++	LS1007	+	LS1707	+
LS702	+	LS1008	+	LS1708	+
LS704	++	LS1009	+	LS1709	++
LS801	+	LS1301	+	LS1802	++
LS802	+	LS1601	+	LS1806	+
LS803	+	LS1602	+	LS1807	+
LS804	+	LS1701	++	LS1904	+
LS807	+	LS1702	++	LS1905	+
LS901	++	LS1703	++	LS1908	+

คัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อรา ซึ่งมีกิจกรรมยับยั้ง 3.1-8.0% ของพื้นที่ ตามระดับการยับยั้งของ Magnusson and Schürer (2001) (ภาพที่ 2ค) จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ LS603 LS604 LS704 LS901 LS1701 LS1702 LS1703 LS1704 LS1709 และ LS1802 ซึ่งแยกเชื้อได้จากหน่อไม้ดอง ผักกาดดอง กิมจิ และขนมจีน นำมาทดสอบอีกครั้ง พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา ได้แก่ LS1701 LS1703 และ LS1702 โดยมีกิจกรรมการยับยั้ง 7.94 6.95 และ 6.84% ของพื้นที่ ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ซึ่งจะปรากฏบริเวณใสอย่างชัดเจนรอบๆ เชื้อแบคทีเรีย (ภาพที่ 3)

การใช้สารละลายเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกมาทดสอบการยับยั้งเชื้อราบนอาหาร PDA พบว่า แบคทีเรียแต่ละไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดย LS1704 LS1709 LS1701 และ LS603 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 18.54 18.15 17.42 และ 17.05 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) แต่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งค่อนข้างต่ำ โดยเชื้อรามีการเจริญที่ต่างกับจานควบคุมเพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจเกิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เชื้อราแข่งขันการใช้สารอาหารได้ดีกว่า จึงพบการเจริญของเชื้อราใกล้เคียงกับเชื้อราในจานควบคุม ส่วนการทดสอบในอาหาร PDA+MRS ซึ่ง MRS เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ส่วนอาหาร PDA เป็นอาหารสำหรับเชื้อรา จึงได้อาหารทั้งสองชนิดมาผสมกัน พบว่า จานเลี้ยงเชื้อที่หยดแบคทีเรียกรดแลคติกลงไป ไม่พบการ

กรมวิชาการเกษตร

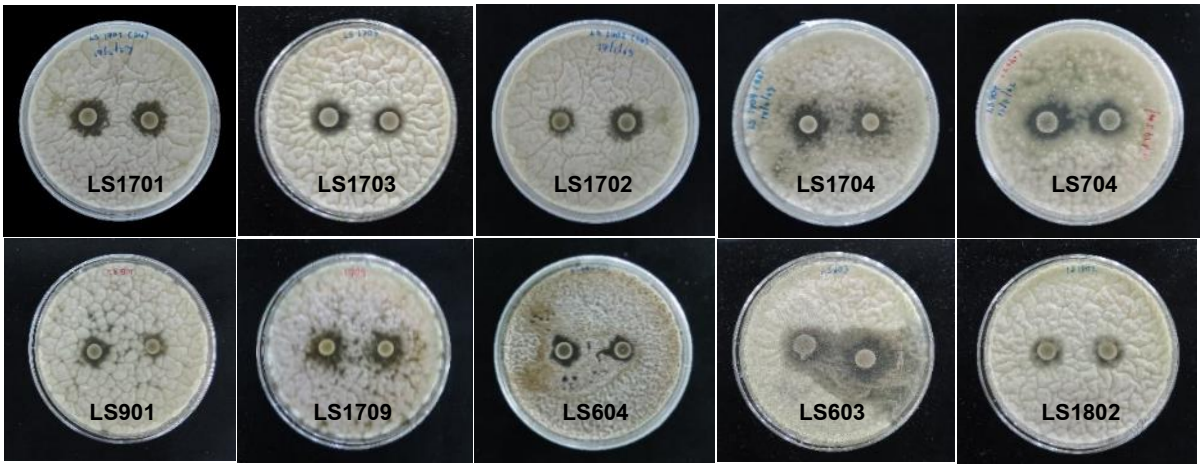
เจริญของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ในขณะที่จานควบคุมซึ่งหยดน้ำกลั่นลงไปพบการเจริญของเชื้อรา โดยวัดการเจริญจากเส้นผ่านศูนย์กลางของเชื้อราที่อายุ 7 วัน ได้เฉลี่ย 5.45 เซนติเมตร ซึ่งแสดงว่าเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกมาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ได้ 100%

และจากการนำสารละลายปราศจากเซลล์ (cell free supernatant) ของแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งอาจมีการสร้างสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อรามาทดสอบ พบเชื้อรามีการเจริญไม่แตกต่างกับชุดควบคุม แสดงว่าสารละลายปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกไม่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อราได้ ซึ่งเมื่อคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่น้อยมาก (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (A39)

isolate	แหล่งที่มา	% Inhibition activity	% inhibition of fungal growth		
			cell suspension [1/] (PDA)	cell suspension (PDA+MRS)	cell free supernatant
LS603	ผักกาดดอง	5.02	17.05 a	เชื้อราไม่เจริญ	2.75
LS604	ผักกาดดอง	5.16	14.22 bcd	เชื้อราไม่เจริญ	0.75
LS704	ผักเสี้ยนดอง	5.25	12.51 d	เชื้อราไม่เจริญ	0.92
LS901	กิมจิ	5.20	13.54 d	เชื้อราไม่เจริญ	3.9
LS1701	หน่อไม้ดอง	7.94	17.42 a	เชื้อราไม่เจริญ	5.48
LS1702	หน่อไม้ดอง	6.84	14.01 cd	เชื้อราไม่เจริญ	4.16
LS1703	หน่อไม้ดอง	6.95	16.67 ab	เชื้อราไม่เจริญ	7.65
LS1704	หน่อไม้ดอง	5.37	18.54 a	เชื้อราไม่เจริญ	1.75
LS1709	หน่อไม้ดอง	5.20	18.15 a	เชื้อราไม่เจริญ	7.27
LS1802	ขนมจีน	4.99	16.47 abc	เชื้อราไม่เจริญ	1.65

[1/]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีวิเคราะห์ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 99%



ศูนย์วิชาการเกษตร

ภาพที่ 3 แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* (A39) พบบริเวณใสชัดเจน มีกิจกรรมยับยั้ง 4.99-7.94%

3. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างสารพิษของแบคทีเรียกรดแลคติก

การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี1 ของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยเก็บชิ้นวุ้นที่มีเชื้อรา *A. flavus* (A39) เจริญ จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ที่อายุ 10 วัน พบว่าเชื้อราที่เจริญจากการทดสอบด้วยสารละลายเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกยังคงมีการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี1 ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง โดยสามารถยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี 1 ได้เพียง 9.77-19.52 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อราที่เจริญจากการทดสอบด้วยสารละลายปราศจากเซลล์ พบว่าเชื้อรามีการสร้างสารพิษในปริมาณสูงใกล้เคียงกับเชื้อราในจานควบคุมเช่นเดียวกัน ซึ่งสารละลายปราศจากเซลล์สามารถยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี1 ได้ 6.82-9.53% (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งสารอะฟลาทอกซิน บี 1 ของแบคทีเรียกรดแลคติก

isolate	% inhibition of AFB1 production	
	cell suspension	cell free supernatant
LS603	16.11	6.90
LS604	16.59	9.53
LS704	18.71	7.11
LS901	9.77	6.82
LS1701	15.31	9.62
LS1702	19.52	8.66
LS1703	17.49	8.52
LS1704	17.19	9.01
LS1709	10.66	5.46
LS1802	18.83	6.79

กรมวิชาการเกษตร

4. การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้น พบว่า แบคทีเรียทุกไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อน (rod) ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งจัดเป็นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก และจากการจำแนกชนิดแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* (A39) ด้วยการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL (Biomerieux, France) สามารถจำแนกแบคทีเรียได้ 4 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus plantarum1* (LS603,LS901), *Lactobacillus plantarum2* (LS1802), *Lactobacillus pentosus* (LS704, LS1701, LS1702, LS1703, LS1704, LS1709) และ *Lactobacillus salivarius* (LS604) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 การจำแนกชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL

isolate	Species of LAB	%Identity
LS603	*Lactobacillus plantarum1*	98.1
LS604	*Lactobacillus salivarius*	86.6
LS704	*Lactobacillus pentosus*	99.7
LS901	*Lactobacillus plantarum1*	93.7
LS1701	*Lactobacillus pentosus*	99.9
LS1702	*Lactobacillus pentosus*	99.9
LS1703	*Lactobacillus pentosus*	99.9
LS1704	*Lactobacillus pentosus*	99.6
LS1709	*Lactobacillus pentosus*	92.4
LS1802	*Lactobacillus plantarum2*	95.7

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* (A39) ได้แก่ *Lactobacillus plantarum1* (LS603, LS901), *L. plantarum2* (LS1802), *L. pentosus* (LS704, LS1701, LS1702, LS1703, LS1704, LS1709) และ *L. salivarius* (LS604)

2. การใช้เซลล์แบคทีเรีย *Lactobacillus* ที่คัดเลือกได้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (A39) ในอาหาร PDA และ PDA+MRS ได้ 12.51-18.54% และ 100% ตามลำดับ และยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน บี 1 ได้ 9.77-19.52%

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. สามารถนำแบคทีเรียกรดแลคติกไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* ในผลิตผลทางการเกษตรได้

2. สามารถนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปทดสอบใช้ในการควบคุมเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราชนิดอื่นๆ

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

12. เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2560. สารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตร. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.

กรมวิชาการเกษตร

ภักดี สุขพันธ์. 2548. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกผลิตแบคเทอริโอซินและเจริญได้ดีในโอลิโกแซคคาไรด์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทมหานคร.

Haskard, C. A., El-Nezami, H. S., Kankaanpää, P. E., Salminen, S., and Ahokas, J. T. 2001. Surface binding of aflatoxin B_1 by lactic acid bacteria. **Appl Environ Microbiol.** 67(7): 3086–3091.

Hernandez-Mendoza A., H.S. Garcia and J.L. Steele. 2009. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B1. **Food Chem Toxicol**. 47(6): 1064-1068.

Khanafari, A., H. Soudi and M. Miraboulfathi. 2007. Biocontrol of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B_1 production in corn. **Iran. J. Environ. Sci. En.** 4(3): 163-168.

Line, J. E. and R. E. Brackett. 1995. Factors affecting aflatoxin B_1 removal by *Flavobacterium aurantiacum*. **Journal of Food Protection** 58(1): 91-94.

Magnusson, J. and J. Schürer. 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. **Applied and environmental microbiology** 67: 1-5.

Teniola, O.D., P.A. Addo, I.M. Brost, P. Färber, K.D. Jany, J.F. Alberts, W.H. van Zyl, P.S. Steyn and W.H. Holzapfel. 2005. Degradation of aflatoxin B_1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov. DSM44556(T). **Int J Food Microbiol.** 105(2): 111-7.

Wulandari, E., H. Yurmiati, T. Subroto and K. Suradi. 2020. Quality and Probiotic Lactic Acid Bacteria Diversity of Rabbit Meat Bekasam-Fermented Meat. **Food Sci. Anim. Resour.** 40(3): 362-376

Yueng, D.L., and I. Laquata. 2003. New Horizons in nutrition. Heinz Handbook of Nutrition, 9th edition. Heinz Corporation Research Center, H.J. Heinz company. 266 p.

กรมวิทยาศาสตร์