เอกสารวิชาการฉบับที่ ๔/๒๕๔๗ Technical Paper No. 4/2004

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติคเพื่อลดการปนเปื้อนของ *Escherichia coli* ในกุ้งกุลาดำ

APPLICATION OF LACTIC ACID BACTERIA TO REDUCE THE CONTAMINATION OF *Escherichia coli* IN BLACK TIGER SHRIMP

โดย

ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ Pawared Inthuserdha
บดินทร์ อิทธิพงษ์ Bordin Ittipong
สิริรัตน์ จงฤทธิพร Sirirat Jongritthiporn
อัธยา กังสุวรรณ Attaya Kungsuwan

กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ
กรมประมง
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Fishery Technological Development Division
Department of Fisheries
Ministry of Agriculture and Cooperative

กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ

เอกสารวิชาการฉบับที่ ๔/๒๕๔๗ Technical Paper No. 4/2004

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติคเพื่อลดการปนเปื้อนของ *Escherichia coli* ในกุ้งกุลาดำ

APPLICATION OF LACTIC ACID BACTERIA TO REDUCE THE CONTAMINATION OF *Escherichia coli* IN BLACK TIGER SHRIMP

กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ

โดย

ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ Pawared Inthuserdha
บดินทร์ อิทธิพงษ์ Bordin Ittipong
สิริรัตน์ จงฤทธิพร Sirirat Jongritthiporn
อัชยา กังสุวรรณ Attaya Kungsuwan

กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ
เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ ๑๐๙๐๐
โทรศัพท์ (๐๒) ๙๔๐๖๑๓๐–๔๕

Fishery Technological Development Division
Kaset-Klang, Chatuchak, Bangkok 10900
Tel. (02) 9406130-45

รหัสทะเบียนวิจัยเลขที่ 44-44-2-07-06-06-3-970-007

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
ABSTRACT	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์	3
วิธีดำเนินการ	4
1. การแยกแบคทีเรียแลคติคจากส้มฟัก	4
2. การทดสอบความสามารถของสารยับยั้งจุลินทรีย์	4
3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารยับยั้ง *E. coli* ในหลอดทดลอง	4
4. การทดสอบการยับยั้ง *E. coli* ที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำ	5
5. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลคติคที่แยกได้จากส้มฟัก	5
ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล	5
1. การแยกแบคทีเรียแลคติคจากส้มฟัก	5
2. การทดสอบความสามารถของสารยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี spot on lawn	6
3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารยับยั้ง *E. coli*	7
4. การทดสอบการยับยั้ง *E. coli* ที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำ	8
5. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลคติคที่ได้จากการทดลอง	9
สรุป	10
เอกสารอ้างอิง	11

กองพัฒนาทรัพยากรมัสต์น้ำ

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติคเพื่อลดการปนเปื้อนของ *Escherichia coli* ในกุ้งกุลาดำ

ปวเรศวร์ อินทุเศรษฐ บดินทร์ อิทธิพงษ์ สิริรัตน์ จงฤทธิพร อัธยา กังสุวรรณ
กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ ๑๐๙๐๐

บทคัดย่อ

แยกแบคทีเรียแลคติคจากส้มฟักจำนวนทั้งสิ้น 118 ไอโซเลต นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคคือ *Salmonella typhimurium* (TISTR 292), *Staphylococcus aureus* (TISTR 029) และ *E. coli* (TISTR 527) โดยวิธี spot on lawn พบว่าแบคทีเรียแลคติคที่แยกได้ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* แต่สามารถยับยั้ง *S. typhimurium* ได้เล็กน้อย และมี 49 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้อย่างชัดเจน โดยเชื้อทดสอบรหัส SF72-66, SF72-70 และ SF72-93 ให้ผลการยับยั้ง *E. coli* ดีที่สุด เมื่อนำเชื้อดังกล่าวมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* ในหลอดทดลอง พบว่า SF72-93 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีที่สุด จึงนำเชื้อดังกล่าวมาทดสอบการยับยั้ง *E. coli* ที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำ โดยการจุ่มกุ้งกุลาดำที่ปนเปื้อน *E. coli* ลงในสารยับยั้งที่ได้จากไอโซเลต SF72-93 เป็นระยะเวลา 1, 5 และ 10 นาที พบว่าปริมาณ *E. coli* ลดลงจากปริมาณเริ่มต้นร้อยละ 78, 87 และ 91 ตามลำดับ ผลการยับยั้งที่เกิดขึ้นเป็นผลเนื่องมาจากกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เมื่อจำแนกชนิดของไอโซเลต SF72-93 โดยทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเป็น *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*

คำสำคัญ : แบคทีเรียแลคติค สารยับยั้ง กุ้งกุลาดำ *E. coli S. typhimurium S. aureus*

กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ

APPLICATION OF LACTIC ACID BACTERIA TO REDUCE THE CONTAMINATION OF *Escherichia coli* IN BLACK TIGER SHRIMP

Pawared Inthuserdha Bordin Ittipong Sirirat Jongritthiporn Attaya Kungsuwan
Fishery Technology Development Division, Department of Fisheries,
Kaset-Klang, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

ABSTRACT

A total of 118 isolates of lactic acid bacteria were isolated from Som-fak (Thai fermented fish). After screening for antibacterial activity against *Salmonella typhimurium* (TISTR 292), *Staphylococcus aureus* (TISTR 029) and *E. coli* (TISTR 527) using spot on lawn method. Forty nine isolated strains showed inhibitory activity against *E. coli* and some strains showed slightly inhibitory activity against *S. typhimurium* but did not show inhibitory activity against *S. aureus*. Among these, three strains showed the highest activity as the following codes, SF72-66, SF72-70 and SF72-93. These strains were chosen for further antagonistic activity assay against *E. coli*. The results showed that SF72-93 exhibited the strongest antibactericidal activity among them. SF72-93 was tested for *E. coli* inhibition on black tiger shrimp. Black tiger shrimp was contaminated on purpose with *E. coli* and then dipped in culture supernatant of SF72-93 for 1, 5 and 10 minute. Colony counting showed that number of *E. coli* was reduced from initial level by 78%, 87% and 91%, respectively according to the dipping time. The reduction effect was due to the acid content in culture supernatant. From the results on biochemical test, SF72-93 is identified as *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus.*

Key words: Lactic acid bacteria, Antimicrobial, Black tiger shrimp, *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus*

กองพัฒนาอุตสาหกรรมประมง

คำนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคคำนึงถึงความสำคัญในเรื่องความปลอดภัยของการบริโภคอาหารมากขึ้น ดังนั้นอาหารที่มีคุณภาพดีจะต้องปราศจากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและสารเคมีตกค้างต่างๆ ได้มีการศึกษาหาวิธีป้องกันการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ ปกตินิยมใช้สารเคมีต่างๆเติมลงในอาหารเพื่อเป็นสารกันเสีย เช่น โปแตสเซียมซอร์เบต โซเดียมซัลไฟต์ โปแตสเซียมซัลไฟต์ เป็นต้น (ศิวาพร, 2535) แต่สารเคมีเหล่านี้ถ้าใช้อย่างไม่ถูกวิธีหรือใช้ในปริมาณที่มากเกินกำหนด จะทำให้เกิดผลเสียต่อผู้บริโภค ดังนั้นจึงควรหาสารที่ได้จากธรรมชาติซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (natural biopreservative) มาใช้ทดแทน มีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ แบคทีเรียกลุ่มนั้นคือแบคทีเรียแลคติค ซึ่งมักพบในอาหารหมักทั่วไป เช่น แหนม ไส้กรอกอีสาน ปลาส้ม ส้มฟัก เป็นต้น แบคทีเรียกลุ่มนี้ใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งอาหารและสร้างกรดอินทรีย์และสารอื่นๆขึ้นมา (Gonzalez *et al*., 1994) ซึ่งสารเหล่านี้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้ (Farias *et al*., 1994) สำหรับสารอื่นๆที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Collins and Aramaki, 1980) และ Bacteriocin (Gonzalez *et al*., 1994) ปัจจุบันมีสารจำพวกแบคเทอริโอซินได้รับอนุญาตให้ใช้ได้ในอาหารคือ ไนซิน (Nisin) (Ennahar *et al*., 1999) ซึ่งได้จากแบคทีเรียแลคติคสกุล *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ดังนั้นถ้าสามารถนำแบคทีเรียแลคติคที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์มาประยุกต์ใช้ในด้านอุตสาหกรรมสัตว์น้ำจะมีประโยชน์อย่างยิ่ง เช่น ใช้ในการยับยั้ง *E. coli* ที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำ เพราะกุ้งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศ ในปี 2544 ไทยได้ส่งออกกุ้งสดแช่แข็งเป็นจำนวนทั้งสิ้น 249,570 ตัน คิดเป็นมูลค่าถึง 96,995.6 ล้านบาท (ยุพินท์, 2545) ซึ่ง *E. coli* เป็นดัชนีที่บ่งบอกถึงสุขลักษณะของอาหารและน้ำดื่ม เนื่องจาก *E. coli* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น และจะถูกขับออกมาพร้อมกับอุจจาระ ดังนั้นถ้ามีการตรวจพบ *E. coli* ในอาหาร แสดงว่าอาหารนั้นมีการปนเปื้อนจากอุจจาระ (นงลักษณ์ และปรีชา, 2547) โดย *E. coli* และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอื่นๆ *เช่น Staphylococcus aureus Salmonella* sp. และ *Vibrio cholerae* ถูกกำหนดเป็นมาตรฐานทางจุลชีววิทยาสำหรับสินค้าสัตว์น้ำส่งออกไปยังต่างประเทศ (กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ, 2547)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้จากแบคทีเรียแลคติค
2. ศึกษาการประยุกต์ใช้สารยับยั้งต่อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำ

วิธีดำเนินการ

1. การแยกแบคทีเรียแลคติคจากส้มฟัก

แยกแบคทีเรียแลคติคจากส้มฟักที่ซื้อจากจังหวัดลพบุรี โดยใช้วิธี pour plate ด้วยอาหารวุ้น MRS บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 48 ชม. เมื่อโคโลนีเจริญนำมาเขี่ยลงบนอาหารวุ้น MRS จากนั้นบ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 48 ชม. ถ่ายโคโลนีเดี่ยวลงบน MRS slant บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นเก็บเชื้อที่แยกได้ไว้ในตู้เย็น 4 °C เพื่อรอการทดสอบในขั้นตอนต่อไป (Ostergaard *et al*., 1998)

2. การทดสอบความสามารถของสารยับยั้งจุลินทรีย์

2.1 การเตรียมสารยับยั้งทำโดยเลี้ยงเชื้อที่แยกได้จากข้อ 1. ในอาหารเหลว MRS บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ไว้ในตู้เย็นเพื่อรอการทดสอบ

2.2 แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (target strains) ใช้ 3 ชนิดคือ *Salmonella typhimurium* (TISTR 292), *Staphylococcus aureus* (TISTR 029) และ *E. coli* (TISTR 527) เตรียมโดยเลี้ยงใน Nutrient broth บ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม.

2.3 การทดสอบความสามารถของสารยับยั้งจุลินทรีย์ใช้วิธี spot on lawn ทำโดยปิเปต target strain ที่ได้จากข้อ 2.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตรใส่ใน soft agar (1.2% agar) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเทลงบน Nutrient agar plate แล้วนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้หน้าวุ้นแห้ง จากนั้นหยดส่วนใสที่ได้จากข้อ 2.1 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 30 °C นาน 24 ชม. ตรวจดูโซนใสที่เกิดขึ้น (Mayr-Harting *et al*., 1972) จากนั้นนำเชื้อที่ให้ผลการยับยั้งดีที่สุดไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ในหลอดทดลองต่อไป

<u>หมายเหตุ</u> จากการทดสอบโดยวิธี spot on lawn พบว่าแบคทีเรียแลคติคที่แยกได้ให้ผลการยับยั้งต่อ *E. coli* มากที่สุด ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปจึงทดสอบเฉพาะการยับยั้ง *E. coli*

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารยับยั้ง *E. coli* ในหลอดทดลอง

3.1 การเตรียมสารยับยั้งทำเช่นเดียวกับข้อ 2.1

3.2 การเตรียม *E. coli* เจือจาง โดยเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 2.2 เมื่อครบ 24 ชม. นำมาเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย 0.85% NaCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างเซลล์และเหวี่ยงอีกหนึ่งครั้ง จากนั้นเติม 0.85% NaCl อีก 1 มิลลิลิตร แล้วเก็บเซลล์ในตู้เย็น 4 °C เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นเจือจางเซลล์ให้ได้ความเข้มข้น 10^4 CFU/ml เพื่อจะได้เห็นผลการยับยั้งที่ชัดเจน (Mayr-Harting *et al*., 1972)

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* ทำโดยเติมสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.1 ปริมาตร 1 ส่วน ต่อปริมาตร *E. coli* เจือจาง 10 ส่วน สำหรับ Control เติม 0.85% NaCl 1 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง จากนั้นทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำเข้าตู้บ่ม 30 °C สุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 2 และ 4 ชม. เพื่อตรวจนับปริมาณ *E. coli* ด้วยวิธี spread plate บน EMB agar บ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. แล้วนับจำนวนโคโลนี (Mayr-Harting *et al*., 1972)

4. การทดสอบการยับยั้ง *E. coli* ที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำ

ซื้อกุ้งกุลาดำทั้งตัวไม่ปอกเปลือกจากตลาดสะพานใหม่ 4 ก.ก. ล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นแบ่งเป็น 4 ส่วน ส่วนละ 1 ก.ก. โดยกุ้งทั้ง 4 ส่วนจะถูกทำให้ปนเปื้อนโดยการจุ่มลงใน *E. coli* เข้มข้น 10^3 CFU/ml ปริมาตร 1 ลิตร เป็นเวลา 1 นาที และทดสอบการยับยั้ง *E. coli* โดยจุ่มกุ้งลงในสารยับยั้งที่ได้จากเชื้อทดสอบที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 โดยใช้เวลาในการจุ่มต่างกันดังนี้

- ส่วนที่ 1 จุ่มลงในสารยับยั้งของเชื้อทดสอบปริมาตร 1 ลิตร เป็นเวลา 1 นาที
- ส่วนที่ 2 จุ่มลงในสารยับยั้งของเชื้อทดสอบปริมาตร 1 ลิตร เป็นเวลา 5 นาที
- ส่วนที่ 3 จุ่มลงในสารยับยั้งของเชื้อทดสอบปริมาตร 1 ลิตร เป็นเวลา 10 นาที
- ส่วนที่ 4 กลุ่มควบคุม (Control)

จากนั้นสุ่มตัวอย่างมาหาปริมาณ *E. coli* ด้วยวิธี spread plate บน EMB agar โดยบ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. แล้วนับจำนวนโคโลนี

5. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลคติคที่แยกได้จากส้มฟัก

ทำโดยการย้อมแกรม ทดสอบเอนไซม์แคตตาเลส การหมักน้ำตาลกลูโคส ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 10 °C และ 45 °C ทดสอบการเจริญในอาหารที่มีเกลือเข้มข้น 6 และ 18 เปอร์เซ็นต์ ทดสอบการเจริญที่ pH 4.4 และ 9.6 ทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท การย่อยเจลลาติน และทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ (Kandler and Weiss, 1984)

ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล

1. การแยกแบคทีเรียแลคติคจากส้มฟัก

ปริมาณแบคทีเรียแลคติคที่พบในตัวอย่างส้มฟักอายุการหมัก 72 ชม. มีจำนวน 5.8×10^8 CFU/g ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Paludan-Muller และคณะ (2001) ที่กล่าวว่าแบคทีเรียแลคติคเป็นแบคทีเรียที่พบได้อย่างเด่นชัดในส้มฟัก โดยส้มฟักที่หมักเป็นเวลา 3 วันจะมีปริมาณแบคทีเรียแลคติคสูงถึง 10^9 CFU/g และจากการทดลองสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้ทั้งสิ้น 118 ไอโซเลต เพื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ในขั้นตอนต่อไป

2. การทดสอบความสามารถของสารยับยั้งจุลินทรีย์ โดยวิธี spot on lawn

ผลทดสอบความสามารถของสารยับยั้งจุลินทรีย์ต่อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค 3 ชนิดคือ *S. typhimurium*, *S. aureus* และ *E. coli* พบว่ามีเชื้อทดสอบ 49 ไอโซเลต สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้แสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งพบว่าเชื้อทดสอบรหัส SF72-66, SF72-70 และ SF72-93 ให้ผลการยับยั้งได้มากกว่าเชื้อทดสอบรหัสอื่นๆ คือเกิดโซนใสเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 20 มิลลิเมตร จึงนำเชื้อดังกล่าวไปทดสอบประสิทธิภาพของการยับยั้ง *E. coli* ในขั้นตอนต่อไป สำหรับผลการยับยั้ง *S. typhimurium* และ *S. aureus* พบว่าเชื้อทดสอบสามารถยับยั้ง *S. typhimurium* ได้เพียงเล็กน้อย โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสไม่เกิน 10 มิลลิเมตร แต่ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความสามารถของสารยับยั้งต่อ *E. coli*

ลำดับที่	รหัสเชื้อทดสอบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มม.)	ลำดับที่	รหัสเชื้อทดสอบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มม.)
1	SF72-2	12	19	SF72-41	10
2	SF72-5	11	20	SF72-44	12
3	SF72-6	10	21	SF72-53	12
4	SF72-7	11	22	SF72-55	11
5	SF72-11	12	23	SF72-56	11
6	SF72-12	10	24	SF72-61	10
7	SF72-13	9	25	SF72-63	10
8	SF72-14	10	26	SF72-65	11
9	SF72-16	11	27	SF72-66	**20**
10	SF72-17	12	28	SF72-67	10
11	SF72-20	12	29	SF72-68	11
12	SF72-22	11	30	SF72-69	12
13	SF72-25	10	31	SF72-70	**20**
14	SF72-31	9	32	SF72-74	11
15	SF72-32	10	33	SF72-77	10
16	SF72-33	12	34	SF72-79	12
17	SF72-34	11	35	SF72-80	9
18	SF72-40	10	36	SF72-81	11

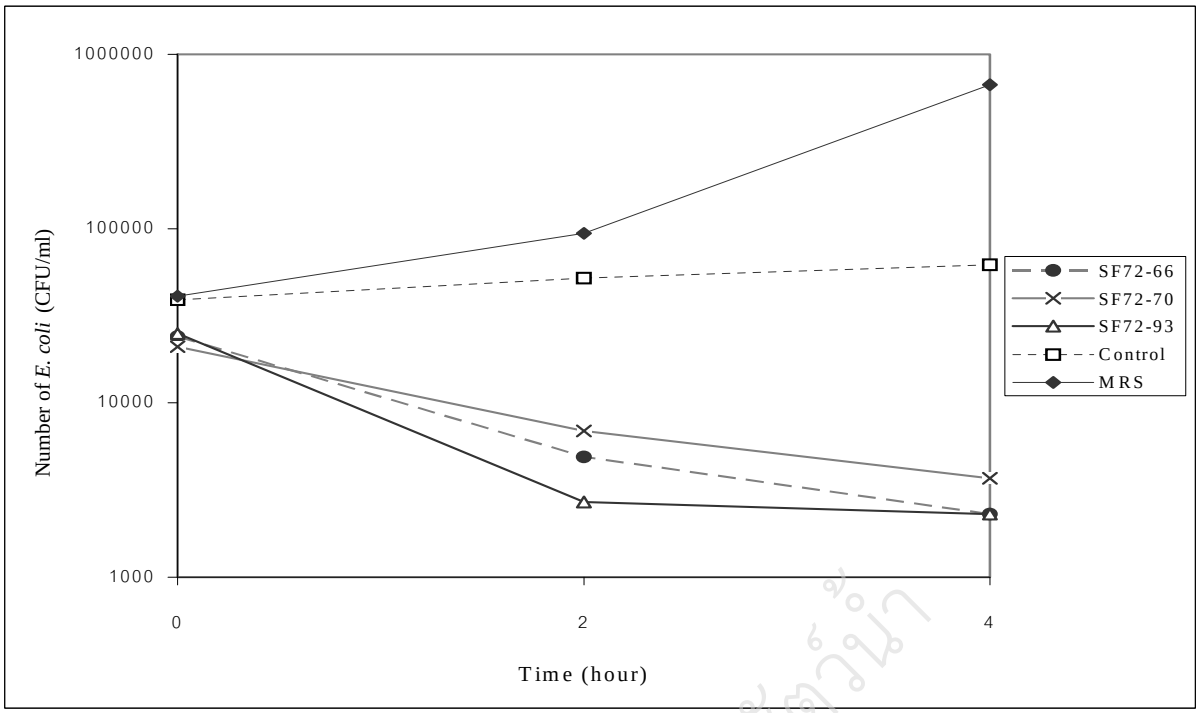
กรมพัฒนาอุตสาหกรรมอาหาร

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความสามารถของสารยับยั้งต่อ *E. coli* (ต่อ)

ลำดับที่	รหัสเชื้อทดสอบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มม.)	ลำดับที่	รหัสเชื้อทดสอบ	เส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มม.)
37	SF72-88	16	44	SF72-109	12
38	SF72-90	10	45	SF72-110	11
39	SF72-92	12	46	SF72-111	10
40	SF72-93	**20**	47	SF72-112	9
41	SF72-100	18	48	SF72-115	11
42	SF72-102	11	49	SF72-118	10
43	SF72-106	10			

3. การทดสอบประสิทธิภาพของสารยับยั้ง *E. coli*

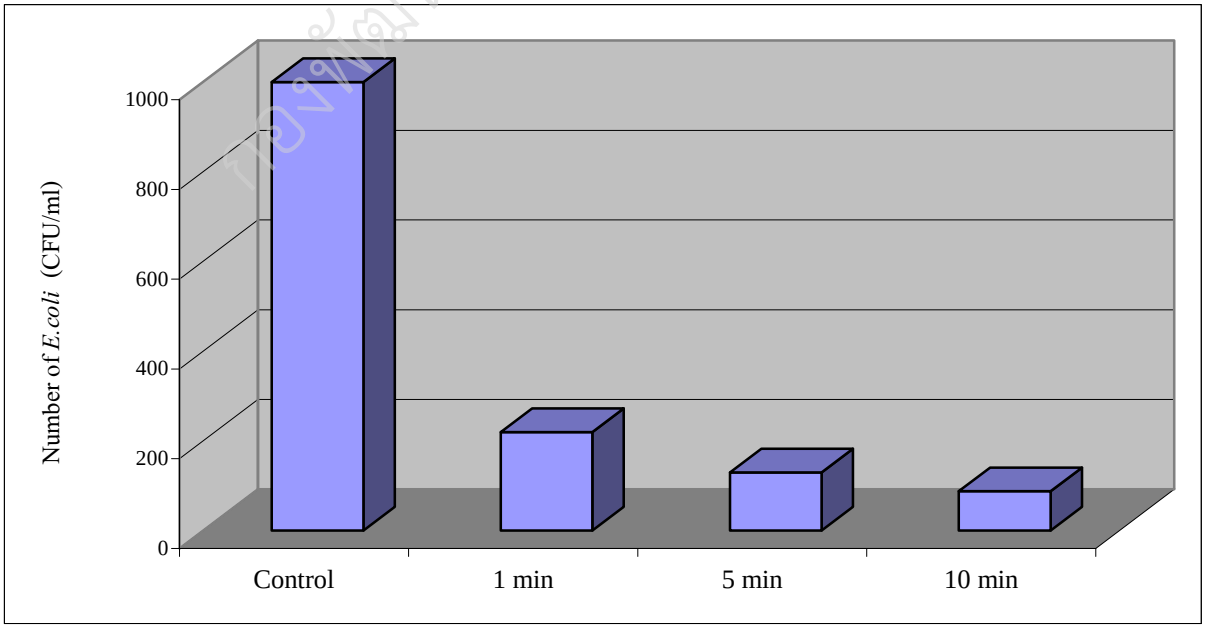
การเติมสารยับยั้งที่ได้จากไอโซเลต SF72-66, SF72-70 และ SF72-93 ลงใน *E. coli* เจือจาง เพื่อทดสอบประสิทธิภาพพบว่าปริมาณ *E. coli* ลดลงในทุกหลอดที่มีการเติมสารยับยั้ง (ดังรูปที่ 1) โดยหลอดที่เติมสารยับยั้งจากไอโซเลต SF72-93 สามารถทำให้เชื้อลดลงได้ 93.25 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 2 ชม. และสำหรับไอโซเลต SF72-66 และ SF72-70 สามารถทำให้เชื้อลดลง 87.75 และ 82.75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณเชื้อในหลอด Control กลับมีจำนวนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ส่วนหลอดที่เติม MRS แทนสารยับยั้ง พบว่ามีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น เนื่องจากเป็นการเพิ่มแหล่งอาหารให้กับ *E. coli* และเป็นที่สังเกตว่าเมื่อเติมสารยับยั้งลงใน *E. coli* เจือจางจะทำให้เชื้อลดลงได้ทันทีประมาณ 41.67 เปอร์เซ็นต์ (ที่เวลา 0 ชม.) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งสามารถฆ่า *E. coli* ได้ (bactericidal) โดยสารยับยั้งจากไอโซเลต SF72-93 มีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้ง *E. coli* จึงเลือกไอโซเลตดังกล่าวมาทดสอบการยับยั้ง *E. coli* ที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำต่อไป



รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณ *E. coli* หลังจากการเติมสารยับยั้งที่ได้จากเชื้อทดสอบ

4. การทดสอบการยับยั้ง *E. coli* ที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำ

นำกุ้งกุลาดำที่ผ่านการปนเปื้อนด้วย *E. coli* เจือจาง จุ่มลงในสารยับยั้งที่ได้จากไอโซเลต SF72-93 เป็นเวลา 1, 5 และ 10 นาที แล้วสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณ *E. coli* ที่เหลืออยู่ ซึ่งผลแสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ปริมาณ *E. coli* ที่เหลืออยู่บนตัวกุ้งหลังการจุ่มลงในสารยับยั้งที่ได้จากไอโซเลต SF72-93

จากรูปที่ 2 พบว่าปริมาณ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในกุ้งกุลาดำลดลงหลังจากการจุ่มกุ้งกุลาดำลงในสารยับยั้ง โดยที่เวลาในการจุ่ม 10 นาที เหลือปริมาณเชื้อน้อยที่สุด คิดเป็น 9 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น รองลงมาเป็นที่เวลาในการจุ่ม 5 นาที เหลือปริมาณเชื้อ 13 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น และที่เวลาในการจุ่ม 1 นาที เหลือปริมาณเชื้อ 22 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น ซึ่งจากการทดลองทำให้ทราบว่า เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการจุ่มยิ่งทำให้ปริมาณเชื้อที่เหลืออยู่ลดลง และเป็นที่สังเกตว่าระยะเวลาในการจุ่มเพียง 1 นาที สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ถึง 78 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเชื้อเริ่มต้น ดังนั้นถ้ามีการนำวิธีนี้ไปประยุกต์ใช้ในโรงงานแปรรูปกุ้งจะเป็นการลดปริมาณ *E. coli* ที่ปนเปื้อนมากับตัวกุ้งได้ ซึ่งจะทำให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากขึ้น

จากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า เมื่อนำสารยับยั้งที่ได้จากการทดลองนี้ไปปรับค่า pH ให้เป็น 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วนำไปทดสอบการยับยั้ง *E. coli* และ *Salmonella* sp. พบว่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อดังกล่าวหมดไป แสดงให้เห็นว่าผลการยับยั้งที่เกิดขึ้นเป็นผลเนื่องมาจากกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียแลคติคสร้างขึ้นมา ซึ่งตรงกับ Rubin และ Vanghan (1979) ที่พบว่า การยับยั้ง *Salmonella typhimurium* ของแบคทีเรียในโยเกิร์ตเกิดจากผลของกรดแลคติค และ Adams และ Hall (1988) รายงานว่ากรดแลคติคและกรดอะซิติกมีผลในการยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* sp.

5. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลคติคที่ได้จากการทดลอง

ทำการทดสอบคุณลักษณะต่างๆของไอโซเลต SF72-93 พบว่าลักษณะดังกล่าวตรงกับแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (Kandler and Weiss, 1984) ซึ่งผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 2

กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบคุณลักษณะต่างๆของไอโซเลต SF72-93

การทดสอบคุณลักษณะ	ผลการทดสอบ	การทดสอบคุณลักษณะ	ผลการทดสอบ
รูปร่าง	rod	การหมักอะราบิโนส	+
การย้อมแกรม	Gram +	การหมักกาแลคโตส	+
การสร้างเอนไซม์แคตตาเลส	-	การหมักแลคโตส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 10 °C	+	การหมักมอลโตส	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 °C	+	การหมักแมนโนส	+
การเจริญในอาหารที่มีเกลือเข้มข้น 6 %	-	การหมักมิลิซิโทส	+
การเจริญในอาหารที่มีเกลือเข้มข้น 18 %	-	การหมักแรมโนส	+
การเจริญที่ pH 4.4	+	การหมักไรโบส	+
การเจริญที่ pH 9.6	-	การหมักซอบิทอล	+
การรีดิวซ์ไนเตรท	-	การหมักซูโครส	+
การย่อยเจลลาติน	-	การหมักทรีฮาโรส	+
การหมักกลูโคส	-	การหมักไซโรส	-

สรุป

การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติคจากตัวอย่างส้มฟักอายุการหมัก 72 ชม. ได้ทั้งหมด 118 ไอโซเลตเพื่อใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคคือ *S. typhimurium*, *S. aureus* และ *E. coli* พบว่าสารยับยั้งที่แบคทีเรียแลคติคสร้างขึ้นไม่มีผลยับยั้ง *S. aureus* และแสดงผลยับยั้ง *S. typhimurium* เพียงเล็กน้อย แต่พบว่ามีผลยับยั้งต่อ *E. coli* อย่างเด่นชัดจำนวน 49 ไอโซเลต และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพพบว่าไอโซเลต SF72-93 สามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ดีที่สุด สำหรับการประยุกต์ใช้สารยับยั้งดังกล่าวในกุ้งกุลาดำที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อ *E. coli* พบว่าการจุ่มกุ้งในสารยับยั้งเพียง 1 นาที สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ 78 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเชื้อเริ่มต้น โดยการยับยั้งที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียแลคติคสร้างขึ้น เมื่อทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลคติคดังกล่าวพบว่าเป็น *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*

เอกสารอ้างอิง

กองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ. 2547. มาตรฐานผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทางจุลชีววิทยาและเคมี. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. กรุงเทพฯ. 29 หน้า.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 735 หน้า.

ยุพินท์ วิวัฒนชัยเศรษฐ์. 2545. ภาวะการค้ากุ้งกุลาดำ. วารสารการประมง. ปีที่ 55 (2): 178-179.

ศิวาพร ศิวเวชช. 2535. วัตถุเจือปนในผลิตภัณฑ์อาหาร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 328 หน้า.

Adams, M.R. and C.J. Hall. 1988. Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. In De Vayst, L. and Vandamme, E.T. 1994. Bacteriocin of lactic acid bacteria. Blackie academic & Professional. London.

Collins, E.B. and K. Aramaki. 1980. Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci*. 63: 681-686.

Ennahar, S., Sonomoto, K. and A. Ishizaki. 1999. Class II bacteriocin from lactic acid bacteria : antibacterial activity and food preservation. *J. Biosci. and Bioeng*. 87(6): 705-716.

Farias, M.E., De Ruiz Holgado, A.P. and F. Sesma. 1994. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheese : inhibition of foodborne pathogens. *J. Food Prot*. 57: 1013-1015.

Gonzalez, B., Arca, P., Mayo, B. and J.E. Suarez. 1994. Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *J. Appl. Environ. Microbiol*. 60: 2158-2163.

Kandler, O. and N. Weiss. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2: 1208-1234.

Mayr-Harting, A., Hedges, A.J. and R.C.W. Berkeley. 1972. Method for studying bacteriocins. *J. Meth. Microbiol*. 7A. 315 – 422.

Ostergaard, A., Embarek, P.K.B., Wedell-Neergaard, C., Huss, H.H. and L. Gram. 1998. Characterization of anti-listerial lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish products. *J. Food Microbiol*. 15: 223-233.

Paludan-Muller, C., Valyasevi, R., Huss, H.H. and L. Gram. 2001. Genotypic and phenotypic characterization of garlic-fermenting lactic acid bacteria isolated from *som-fak*, a Thai low-salt fermented fish product. *J. App. Microbiol*. 91:1-8.

Rubin, H.E. and F. Vaughan. 1979. Elucidation of the inhibitory factors of yogurt against *Salmonella typhimurium*. *J. Dairy Sci*. 62: 1873-1879.