การคัดเลือกบาซิลลัสที่ผลิตแบคเทอริโอซินต้านเชื้อก่อโรคปลาจากอาหารหมักและการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคเทอริโอซิน

ศิริพร ทิพย์สิงห์[1] เสาวนิต ทองพิมพ์[2] และรัชนู เมยดง[1*]

[1]สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ธนบุรี กรุงเทพฯ 10600
[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002
[*]E-mail: ratchanu.me@bsru.ac.th

รับบทความ: 27 พฤศจิกายน 2561 แก้ไขบทความ: 23 มีนาคม 2562 ยอมรับตีพิมพ์: 30 เมษายน 2562

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินจากบาซิลลัสที่แยกจากอาหารหมักของไทย โดยบาซิลลัส 258 ไอโซเลตแยกมาจากตัวอย่างอาหารหมักจำนวน 62 ตัวอย่างและนำไปศึกษาความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซินต้านเชื้อก่อโรคปลาด้วยวิธี agar well diffusion assay ผลการวิจัยพบว่า ไอโซเลต BB60a ซึ่งแยกมาจากผลิตภัณฑ์ปลาส้ม มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเชื้อก่อโรคปลาที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (*Streptococcus agalactiae*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Aeromonas hydrophila*) เมื่อจำแนกระบุชนิดของไอโซเลต BB60a ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับลำดับ 16S rDNA พบว่า มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus megaterium* ร้อยละ 99.83 นอกจากนี้ยังศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อ *B. megaterium* BB60a ในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน พบว่า yeast extract ความเข้มข้น 12 กรัมต่อลิตรที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อช่วยส่งเสริมให้เชื้อผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงสุด ($p < 0.05$) จากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารแบคเทอริโอซินพบว่ามีความเสถียรในช่วง pH 4–10 และในช่วงอุณหภูมิ 40–70ºC และพบว่าสารนี้ถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ trypsin และ proteinase K แต่ทนต่อเอนไซม์ α-amylase และ lipase จากผลการศึกษานี้สรุปได้ว่าแบคเทอริโอซินจาก *B. megatherium* BB60a ออกฤทธิ์การยับยั้งเป็นแบบ broad spectrum ทนสภาพกรด–เบสได้ในช่วงกว้าง และทนต่อความร้อน จึงเหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงปลาเพื่อยับยั้งการติดเชื้อก่อโรคปลา

คำสำคัญ: บาซิลลัส แบคเทอริโอซิน เชื้อก่อโรคปลา

Screening of Bacteriocin–Producing *Bacillus* against Fish Pathogens from Fermented Foods and Preliminary Characterization of the Bacteriocin

Siriporn Tipsing[1], Saowanit Tongpim[2] and Ratchanu Meidong[1*]

[1]Microbiology Program, Department of Science, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Thonburi, Bangkok, 10600, Thailand

[2]Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002, Thailand

[*]E-mail: ratchanu.me@bsru.ac.th

Received: 27 November 2018 Revised: 23 March 2019 Accepted: 30 April 2019

Abstract

The aims of this study were to screen and preliminarily characterize the properties of bacteriocin produced by *Bacillus* isolated from Thai fermented foods. In this study, 258 isolates of *Bacillus* were obtained from 62 samples of Thai fermented foods and screened for their bacteriocin against fish pathogens. Antimicrobial activity of bacteriocin was evaluated using an agar well diffusion assay. Isolate BB60a derived from fermented fish product showed the highest antimicrobial activities against fish pathogens which were both Gram positive (*Streptococcus agalactiae*) and Gram negative (*Aeromonas hydrophila*) bacteria. Bacterial identification based on cell morphology and 16S rDNA sequence revealed that the isolate BB60a was closely related to *Bacillus megaterium* (99.83% similarity). The effect of nitrogen sources on bacteriocin production was investigated. *B. megaterium* BB60a produced the highest bacteriocin when cultivated in the medium containing 12 g/L yeast extract. This bacteriocin showed stability over a wide range of pH (4–10) and temperatures (40–70ºC). It was denatured completely by trypsin and proteinase K, but not by α-amylase and lipase. From this study, it can be concluded that *B. megaterium* BB60a produces a broad-spectrum bacteriocin that tolerates acidic, alkaline and high temperature conditions and, therefore, it has the potential application in fish culture to prevent bacterial fish infection.

Keywords: *Bacillus,* Bacteriocin, Fish pathogens

บทนำ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นที่นิยมในประเทศไทย โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืด เนื่องจากเนื้อปลาเป็นแหล่งของโปรตีนที่มีคุณค่า อีกทั้งยังมีราคาถูก เลี้ยงง่าย และโตเร็ว การเพาะเลี้ยงปลานอกจากจะเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญภายในประเทศแล้วยังมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจเนื่องจากเป็นสินค้าที่มีการส่งออกไปยังต่างประเทศปีละหลายล้านตัน โดยปลาสายพันธุ์ที่นิยมเลี้ยง ได้แก่ ปลานิล ปลาไน ปลาตะเพียน ปลาช่อน ปลาสลิด ปลาดุก และปลาสวาย (Fishery Information Technology Center, 2017) จากการเพาะเลี้ยงปลาที่มากขึ้นจนกลายเป็นอุตสาหกรรม ทำให้การเลี้ยงปลาอยู่ในสภาพที่หนาแน่น รวมถึงยังสุขาภิบาลฟาร์มที่ไม่เหมาะสม สภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงไป ล้วนแต่เป็นสาเหตุที่ทำให้ปลาเกิดความเครียด ภูมิคุ้มกันโรคต่ำลง และเกิดโรคติดเชื้อต่าง ๆ ตามมาได้ง่ายโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคติดเชื้อจากแบคทีเรีย (Tipia–paniagua et al., 2014) ซึ่งเชื้อที่เป็นสาเหตุสำคัญในการก่อโรคและพบได้มากในการเลี้ยงปลาน้ำจืดของไทยคือแบคทีเรียในกลุ่ม *Aeromonas* spp. และ *Streptococcus* spp. (Maisak et al., 2013) ซึ่งวิธีการที่ผู้เลี้ยงนิยมใช้ในการรักษาคือการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งโรคติดเชื้อในปลา แต่กลับนำมาซึ่งผลเสียโดยเฉพาะอย่างยิ่งคือการเพิ่มขึ้นของแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะและการตกค้างของยาปฏิชีวนะซึ่งส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค (Smith, 2008) และผลิตภัณฑ์ที่มีสารปฏิชีวนะตกค้างไม่เป็นที่ยอมรับให้จำหน่ายในบางประเทศ (Regulation (EC) No 1831/2003)

จากเหตุผลที่กล่าวมาทำให้ผู้เลี้ยงจำเป็นต้องหาแนวทางในการป้องกันเชื้อก่อโรคเหล่านี้ ไม่ว่าจะเป็นการใช้วัคซีน สารสกัดจากพืช และอีกทางเลือกหนึ่งคือการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกส์ (probiotics) เพื่อใช้ทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้แบคทีเรียโพรไบโอติกส์ได้รับความสนใจในการเพาะเลี้ยงปลาเนื่องจากได้ผลเป็นที่ยอมรับว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของปลา กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และช่วยให้ปลาต้านทานต่อการติดเชื้อก่อโรค (Meidong et al., 2018; Nayak, 2010; Newaj–Fyzul and Austin, 2015) โดย FAO/WHO (2006) ให้คำนิยามของโพรไบโอติกส์ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่เมื่อโฮสต์ได้รับเข้าไปในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยส่งเสริมการเจริญของโฮสต์ได้ แบคทีเรียที่นำมาใช้เป็นโพรไบโอติกส์ในปลา ได้แก่ กลุ่ม lactic acid bacteria (Xia et al., 2018) *Bacillus* (Gobi et al., 2018; Meidong et al., 2018) actinobacteria (Das et al., 2010) และยีสต์ (Hassaan et al., 2018) แบคทีเรียโพรไบโอติกส์มีสมบัติสำคัญ ได้แก่ ความสามารถในการทนต่อภาวะทางเดินอาหาร ความสามารถในการเกาะเยื่อบุลำไส้เล็ก และความสามารถในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ก่อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตสารแบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นสารประกอบกลุ่มโปรตีนหรือเพปไทด์ที่สังเคราะห์จากไรโบโซม (O'sullivan et al., 2002) สามารถยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มใกล้เคียงกัน (Lee and Chang, 2018) หรือยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มอื่นทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Cladera–Olivera et al., 2004; Scholz et al., 2014) สารประกอบกลุ่มแบคเทอริโอซินผลิตมาจากแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น แบคทีเรียสร้างกรดแลกติก (Hwanhlem et al., 2017) กลุ่มบาซิลลัส (Lee and Chang, 2018; Scholz et al., 2014) แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบที่ทนต่อ

ความร้อน แต่สามารถถูกทำลายจากเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยโปรตีน ปัจจัยที่ส่งผลในการผลิตแบคเทอริโอซินขึ้นกับองค์ประกอบในอาหาร ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ค่ากรด–เบสในอาหาร รวมถึงภาวะในการบ่ม โดยเฉพาะอุณหภูมิที่เหมาะสมของจุลินทรีย์สายพันธุ์นั้น ๆ (Embaby et al., 2014) สมบัติในการผลิตสารแบคเทอริโอซินมีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากช่วยทำลายเชื้อก่อโรคปลา จึงทำให้ปลามีความแข็งแรงปราศจากการติดเชื้อก่อโรค และเจริญได้ดี (Dobson et al., 2012; Fontana et al., 2013) จึงเป็นเหตุผลหลักข้อหนึ่งของงานวิจัยนี้ โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ที่ดีต้องแยกได้จากแหล่งที่เหมาะสม โดยอาหารหมักเป็นแหล่งที่มีรายงานว่าเป็นแหล่งของโพรไบโอติกส์ที่มีศักยภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งของบาซิลลัส ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความเหมาะสมในการสามารถพัฒนาไปใช้ในการเพาะเลี้ยงปลาได้ เนื่องจากสามารถสร้างสปอร์ได้จึงทำให้รอดชีวิตได้สูง (Inatsu et al., 2002; Lee and Chang, 2018; Meidong et al., 2018) จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้โดยแยกบาซิลลัสที่มีสมบัติในการผลิตสารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในปลาจากตัวอย่างอาหารหมัก และศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคเทอริโอซินที่บาซิลลัสผลิตขึ้น เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนในการนำเชื้อแบคทีเรียนี้ไปพัฒนาเป็นโพรไบโอติกส์ในการเพาะเลี้ยงปลาต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การแยกเชื้อกลุ่มบาซิลลัสที่ผลิตแบคเทอริโอซินจากตัวอย่างอาหารหมัก

แยกเชื้อบาซิลลัสจากตัวอย่างอาหารหมักที่นำมาจากตลาดท้องถิ่นในจังหวัดต่าง ๆ ของภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ด้วยวิธี heat treatment (ดัดแปลงจาก Guo et al. (2006) โดยใส่ตัวอย่างอาหารหมักปริมาณ 2 g ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ mixed nutrient broth (peptone, 5.0 g/L; beef extract, 3.0 g/L; glucose, 5.0 g/L; yeast extract, 1.0 g/L; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.5 g/L, pH 7.0) ปริมาตร 10 mL และไปบ่มที่บ่มแบบเขย่า (35ºC, 150 rpm) เป็นเวลา 24 h จากนั้นนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 80ºC เป็นเวลา 15 นาที ก่อนทำ serial dilution และกระจายเชื้อบนอาหาร mixed nutrient agar นำไปบ่มที่ 35ºC เป็นเวลา 24 h และเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะแตกต่างกันไปศึกษาลักษณะของเชื้อกลุ่มบาซิลลัส (แกรม บวก รูปร่างท่อน สร้างเอนไซม์แคทาเลส และสร้างสปอร์) เก็บไอโซเลตที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วในกลีเซอรอล 20%(v/v) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –80ºC เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

แบคทีเรียก่อโรคปลาที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *Aeromonas hydrophila* FW52 และ *Streptococcus agalactiae* F3S (Tongpim et al., 2009) ซึ่งเก็บในกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 20%(v/v) ที่อุณหภูมิ –80ºC ก่อนนำไปใช้ในการทดลองได้เลี้ยงใน Muller Hinton broth (Himedia, India) และบ่มที่ 35ºC เป็นเวลา 18 h จากนั้นปรับให้มีค่าความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5 ก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง

นำบาซิลลัสทุกไอโซเลตมาศึกษากิจกรรมการผลิตแบคเทอริโอซินด้วยวิธี agar well diffusion technique (Hwanhlem et al., 2017) โดยเลี้ยงบาซิลลัสแต่ละไอโซเลตในอาหาร mixed NB บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (ที่ 35ºC, 150

rpm) เป็นเวลา 18 h จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7000 rpm, 4ºC (MPW MED, Instruments, Poland) เป็นเวลา 10 min เพื่อแยกเซลล์ออก นำส่วนใสไปปรับให้มี pH เท่ากับ 7.0 ด้วย 2 N NaOH เพื่อป้องกันผลที่มาจากกรดอินทรีย์ เติมเอนไซม์แคทาเลส (catalase; Himedia, India) ความเข้มข้น 1 mg/mL เพื่อกำจัดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 65ºC นาน 5 min และแช่ในน้ำเย็นทันที จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 µm (Sartorius, Germany) ซึ่งจะได้สารละลายส่วนใสที่มี pH เป็นกลางและปราศจากเชื้อ (cell–free neutralized supernatant, CFNS) เพื่อใช้ทดสอบต่อไป จากนั้นนำเชื้อก่อโรคปริมาตร 100 µL ลงใน Muller Hinton soft agar (0.7% agar) ปริมาตร 5 mL เทราดบน Muller Hinton agar ปริมาตร 15 mL แล้วปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว เจาะหลุมทดสอบด้วย cork borer ขนาด 6 mm และหยด CFNS ที่เตรียมไว้ลงในหลุม ๆ ละ 50 µL และนำไปบ่มที่ตู้บ่ม 35ºC เป็นเวลา 18 h ตรวจผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้น

การจำแนกเชื้อที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

จำแนกเชื้อไอโซเลต BB60 โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ร่วมกับการจำแนกโดยใช้ลำดับ 16S rDNA โดยเพิ่มจำนวนยีนที่บริเวณ 16S rRNA gene ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 20F (5'-GAG TTTGATCCTGGCTCAG-3') และ 1500R (5'-GTT ACCTTGTTACGACTT-3') โดยผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ด้วย GenepHlowTM Gel/PCR Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) และนำลำดับ 16S rDNA ที่ได้เปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) และ EzTaxon server (Kim et al., 2012) และนำไปสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 5

ศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ผลิตแบคเทอริโอซิน

อาหารเลี้ยงเชื้อในการศึกษานี้ดัดแปลงมาจาก Guo et al. (2006) โดยศึกษาความเข้มข้นของ yeast extract ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของไอโซเลต BB60a เริ่มจากเตรียม inoculum ของบาซิลลัสในอาหาร mixed NB นำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 35ºC และความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 1 คืน นำ inoculum ของบาซิลลัสเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 สูตร (ตาราง 1) ปริมาตร 100 mL/250 mL flask ให้มีความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 35ºC ความเร็วรอบ 150 rpm ภายหลังบ่มเป็นเวลา 24 h ตรวจสอบการผลิตแบคเทอริโอซิน เพื่อยับยั้งเชื้อ *A. hydrophila* FW52 และ *S. agalactiae* F3S ในสูตรอาหารต่าง ๆ ด้วยวิธี agar well diffusion assay

ตาราง 1 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

องค์ประกอบ	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ (%, w/v)				
	MNB1	MNB2	MNB3	MNB4	MNB5
peptone	5	5	5	5	5
beef extract	3	3	3	3	3
glucose	5	5	5	5	5
yeast extract	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

ศึกษาการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซิน

เตรียม inoculum ของบาซิลลัสในอาหารสูตร MNB4 ซึ่งเป็นสูตรที่มีการผลิตแบคเทอริโอซินสูงสุด นำไปบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 35ºC

ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 18 h จากนั้นนำ inoculum ของ BB60a ใส่ลงในอาหาร MNB4 ปริมาตร 100 mL/250 mL flask ให้มีความขุ่นเริ่มต้น OD_{600} เท่ากับ 0.1 และบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ 35ºC และความเร็วรอบ 150 rpm จากนั้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ตรวจวัดการเจริญโดยวัดความขุ่นของเชื้อที่ OD_{600} และค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนหนึ่งนำมาศึกษาการผลิตแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อก่อโรค *A. hydrophila* FW52 ด้วยวิธี agar well diffusion assay ตามวิธีที่ได้อธิบายไว้ข้างต้น

ศึกษาผลของ pH เอนไซม์ และความร้อนต่อการทำงานของแบคเทอริโอซิน

ศึกษาผลของ pH ต่อแบคเทอริโอซินจากเชื้อ BB60a โดยนำ CFNS มาปรับให้มีค่า pH ระหว่าง 2–10 โดยใช้ 1 N HCl หรือ 1 N NaOH นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 1 h เมื่อครบเวลาปรับให้เป็น pH 7.0 จากนั้นศึกษาผลของ pH stability ที่มีผลต่อแบคเทอริโอซิน ด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยทดสอบกับ *A. hydrophila* FW52

สำหรับการตรวจผลของเอนไซม์ต่อการทำงานของแบคเทอริโอซิน เริ่มจากนำ CFNS เติมเอนไซม์ proteinase K (Sigma, USA) trypsin (Sigma, USA), lipase (Sigma, USA) และ α–amylase (Himedia, India) ความเข้มข้น 1 mg/mL จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 1 h จากนั้นศึกษาผลของเอนไซม์ต่อแบคเทอริโอซินด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยทดสอบกับ *A. hydrophila* FW52

ศึกษาผลของความร้อนต่อแบคเทอริโอซินโดยนำ CFNS ของไอโซเลต BB60a มาเติมเอนไซม์แคทาเลส (CFNS-cat) ดังวิธีที่อธิบายไว้ข้างต้นและบ่มที่อุณหภูมิ 40–100ºC เป็นเวลา 30 min จากนั้นศึกษากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion assay

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ทุกการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง และวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one–way analysis of variance, ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการทดลอง

ผลการแยกเชื้อบาซิลลัสและการผลิตแบคเทอริโอซิน

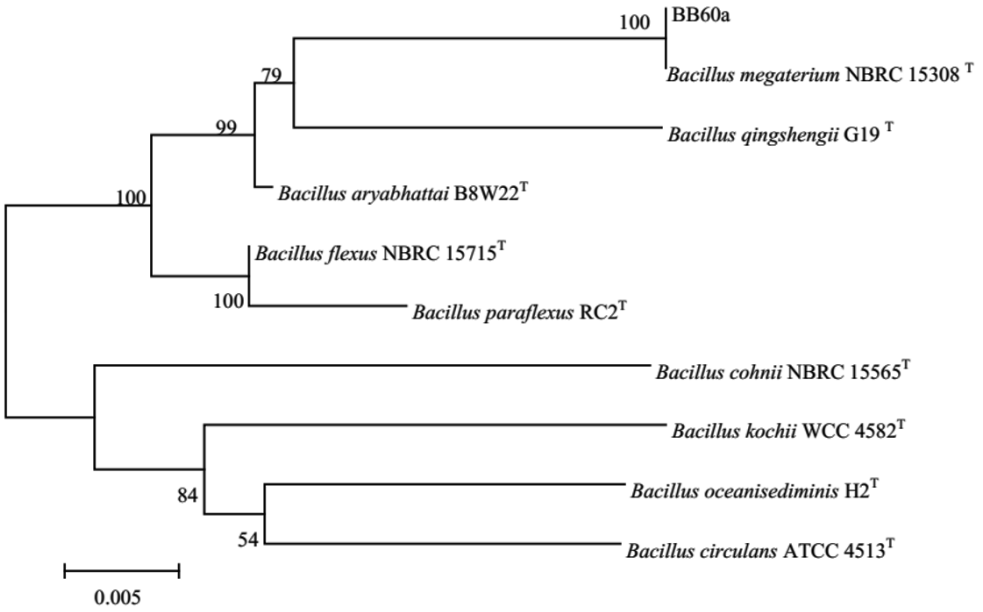
ตัวอย่างอาหารหมักที่นำมาศึกษา ได้แก่ ปลาส้ม ผักกาดดอง ปลาจ่อม แหนมหมู ปลาส้มแหนมเนื้อ ส้มหมูชิ้น และจิ้นปลาหลอด จำนวน 62 ตัวอย่าง แยกเชื้อบาซิลลัสได้จำนวน 258 ไอโซเลต โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เบื้องต้นของบาซิลลัส ได้แก่ การติดสีแกรมบวก การสร้างสปอร์ และการสร้างเอนไซม์แคทาเลส

จากการศึกษาการผลิตแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อก่อโรคปลาของบาซิลลัสทั้ง 258 ไอโซเลต พบว่า มี 3 ไอโซเลตที่ยับยั้ง *A. hydrophila* FW52 มี 11 ไอโซเลตที่ยับยั้ง *S. agalactiae* F3S และมี 19 ไอโซเลตที่ยับยั้งทั้ง *A. hydrophila* FW52 และ *S. agalactiae* F3S (ข้อมูลไม่ได้แสดงไว้) จากผลการทดลองนี้ผู้วิจัยได้เลือกไอโซเลต BB60a ซึ่งแยกมาจากปลาส้มไปศึกษาต่อ เนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคปลาทั้งสองสายพันธุ์ได้สูงที่สุด โดยมีบริเวณใสในการยับยั้ง *A. hydrophila* FW52

และ *S. agalactiae* F3S เท่ากับ 17.6 มิลลิเมตร และ 14.9 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ผลการจำแนกไอโซเลต BB60a

ไอโซเลต BB60a เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างสปอร์และเอนไซม์แคทาเลส เมื่อวิเคราะห์ลำดับ 16S rDNA (1450 bp) พบว่า มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus megaterium* ที่ร้อยละความเหมือนเท่ากับ 99.83 โดย phylogenetic tree แสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 Phylogenetic tree ของไอโซเลต BB60a เมื่อเทียบกับแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp.

ผลของ pH ความร้อน และเอนไซม์ต่อการทำงานของแบคเทอริโอซิน

จากการตรวจสอบคุณลักษณะของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากไอโซเลต BB60a (ตาราง 2) พบว่า แบคเทอริโอซินจาก BB60a สามารถทนต่อ pH ได้ใน ช่วง pH 4–10 โดยมีกิจกรรมสูงที่สุดเมื่อตรวจ-สอบจากขนาดบริเวณยับยั้งคือที่ pH 8 สามารถทนความร้อนได้ในช่วงอุณหภูมิ 40–70ºC นาน 30 min เมื่อทดสอบกับเอนไซม์ catalase, α-amylase และ lipase ยังคงมีกิจกรรมต้านเชื้อทดสอบ แต่เมื่อทดสอบกับเอนไซม์ trypsin และ proteinase K ไม่พบกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อทดสอบ

อภิปรายผล

อาหารหมักเป็นแหล่งที่เหมาะสมในการแยกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน งานวิจัยนี้สามารถแยก *B. megaterium* BB60 จากปลาส้มที่ผลิตแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อก่อโรคปลาสายพันธุ์ *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ได้ ปลาส้มเป็นอาหารหมักที่ทำมาจากเนื้อปลา เป็นที่นิยมบริโภคเนื่องจากมีรสชาติอร่อย ปรุงอาหารได้หลายประเภทและหารับประทานได้ง่าย นอกจากนี้อาหารหมักชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานการแยกเชื้อบาซิลลัสที่มีความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน ดังในงานวิจัยของ

ตาราง 2 ผลของ pH เอนไซม์ และความร้อนต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

		บริเวณใสของการยับยั้ง *A. hydrophila* FW52 (mm)
pH:	4	16.4±0.6
	6	19.3±0.3
	8	19.4±0.2
	10	14.3±0.5
เอนไซม์ (1 mg/mL)		
	α–amylase	17.42±1.3
	lipase	17.37±0.9
	catalase	18.32±0.6
	proteinase K	0
	trypsin	0
อุณหภูมิ (ºC)		
	40	19.4±0.2
	50	19.3±0.4
	60	18.2±0.3
	70	17.7±0.5

Lee and Chang (2018) ได้ *B. subtilis* SN7 ที่ผลิตสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารได้จากเมจู (meju) ซึ่งเป็นอาหารหมักที่ทำจากถั่วเหลืองทั้งยังเป็นแบคเทอริโอซินที่แบคเทอริโอซินชนิดใหม่ เรียกว่า เมจูซิน (mejucin) จะเห็นได้ว่าอาหารหมักนั้นเป็นแหล่งที่มีความเหมาะสมในการนำมาแยกบาซิลลัสที่มีความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน นอกจากนี้ *B. megaterium* BB60 ที่แยกได้ในงานวิจัยนี้ยังมีคุณสมบัติผลิตสารออกฤทธิ์ที่สามารถทำลายเชื้อก่อโรคปลาได้แบบกว้าง (broad spectrum) โดยสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สนใจที่มีการศึกษาในงานวิจัยอื่น ๆ เช่น Lee and Chang (2018) ได้แยก *B. subtilis* NS7 จากอาหารหมักที่ทำจากถั่วเหลือง พบว่าสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก (*B. cereus, B. licheniformis, Listeria monocytogenes, Micrococcus luteus* และ *Staphylococcus aureus*) และแกรมลบ (*Salmonella enteritica* serovar. Typhi, *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* และ *Vibrio parahaemolyticus*) ซึ่งคุณสมบัตินี้ช่วยให้สามารถประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินได้กว้างและเป็นที่ต้องการเนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้หลากหลาย เช่น Meidong et al. (2017) แยก *B. siamensis* ได้จากผักดองและมีความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซินยับยั้งเชื้อก่อโรคปลา *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* เมื่อนำ *B. siamensis* มาเลี้ยงปลาดุก พบว่า สามารถช่วยให้ปลาต้านทานต่อเชื้อก่อโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลาดุกได้

จากการศึกษาการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซิน พบว่า *B. megaterium* BB60a เริ่มผลิตแบคเทอริโอซินในระยะ mid–log phase ของการเจริญและมีการผลิตสูงสุดในระยะ early stationary phase จากนั้นการผลิตแบคเทอริโอซินของ *B. megatherium* BB60a ลดลง อาจเนื่องจากการที่แบคเทอริโอซินถูกดูดซับไว้ที่เซลล์หรืออาจถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Parente et al., 1994) รูปแบบการเจริญและการผลิตสารแบคเทอริโอซินของ *B. megatherium* BB60a มีความคล้ายคลึงกับบาซิลลัสสายพันธุ์อื่น เช่น *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD110 (Cherif et al., 2008) และ *B. amyloliquefaciens* An6 (Ayed et al., 2015)

หลังจากคัดเลือกบาซิลลัสที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินยับยั้งเชื้อก่อโรคปลา จึงศึกษาปัจจัยที่ส่งเสริมการผลิตแบคเทอริโอซินของ *B. megaterium* BB60 พบว่า เมื่อเลี้ยงบาซิลลัสใน

อาหารที่มี yeast extract ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.2 ทำให้เชื้อผลิตแบคเทอริโอซินยับยั้งเชื้อก่อโรคปลาสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ($p < 0.05$) โดยความเข้มข้นที่น้อยกว่าร้อยละ 1.2 (ร้อยละ 0.6, 0.8 และ 1.0) อาจเป็นความเข้มข้นที่ไม่เพียงพอต่อการเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซินของ *B. megaterium* BB60 ซึ่ง yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญของแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญและการผลิตสารที่สำคัญ ในงานวิจัยของ Anthony et al. (2009) พบว่า yeast extract ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4.5 มีอิทธิพลต่อการส่งเสริมการผลิตแบคเทอริโอซินของ *B. licheniformis* AnBa9 และสูงกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนจาก NH_4NO_3 Ayed et al. (2015) ศึกษาองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารแบคเทอริโอซินของ *B. amyloliquefaciens* An6 พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมการผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงที่สุดคือ yeast extract ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 เมื่อเทียบกับ peptone, soya peptone, NH_4Cl, $NaNO_3$, $(NH_4)_2SO_4$ และ casein เมื่อใช้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 Embaby et al. (2014) รายงานผลการศึกษา yeast extract ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.2 ต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ของบาซิลลัส พบว่า ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 ส่งเสริมให้บาซิลลัสผลิตแบคเทอริซินสูงสุด จึงเห็นได้ชัดเจนว่า yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญในการส่งเสริมการผลิตแบคเทอริโอซินของบาซิลลัส รวมทั้งความเข้มข้นของ yeast extract ที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ศึกษาด้วย

การศึกษาคุณลักษณะของแบคเทอริโอซินที่ *B. megaterium* BB60 ผลิตได้มีความสำคัญในการจำแนกชนิดของแบคเทอริโอซิน ในงานวิจัยนี้ได้จำแนกเบื้องต้นโดยศึกษาผลของ pH ความร้อน และเอนไซม์ต่อการทำงานของแบคเทอริโอซิน พบว่า แบคเทอริโอซินจาก *B. megaterium* BB60 ถูกทำลายอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ trypsin และ proteinase K แต่ทนต่อเอนไซม์ α-amylase และ lipase ซึ่งเป็นการยืนยันว่าสารต้านแบคทีเรียก่อโรคที่เชื้อนี้ผลิตได้เป็นสารกลุ่มโปรตีน (Ayed et al., 2015) นอกจากนี้คุณสมบัติอื่นของแบคเทอริโอซินจาก *B. megaterium* BB60 คือ ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 60–90ºC และสามารถทนต่อค่าpH ได้ในช่วง 4–10 ทั้งนี้ Salazar et al. (2017) พบว่า แบคเทอริโอซินจาก *B. amyloliquefaciens* ELI149 ทนต่อความร้อนได้ที่อุณหภูมิในช่วง 60–100ºC และสามารถทนต่อค่า pH ได้ในช่วง 2–10 โดยคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินดังกล่าวเป็นสิ่งที่ต้องศึกษาเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *B. megaterium* BB60a ที่แยกมาจากปลาส้มมีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลาชนิด *A. hydrophila* และ *S. agalactiae* ได้สูง แบคเทอริโอซินที่แบคทีเรียชนิดนี้ผลิตได้ยังสามารถทนต่อค่า pH และความร้อนในช่วงกว้าง ทั้งยังสามารถส่งเสริมให้ผลิตแบคเทอริโอซินได้เพิ่มขึ้น เมื่อศึกษาการเติมแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นเหมาะสม นอกจากนี้แบคทีเรียชนิดนี้ยังเป็นเชื้อที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงปลาได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติที่สำคัญคือสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งควรศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียชนิดนี้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Anthony, T., Rajesh, T., Kayalvizhi, N., and Gunasekaran, P. (2009). Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. **Bioresource Technology** 100(2): 872–877.

Ayed, H. Ben, Maalej, H., Hmidet, N., and Nasri, M. (2015). Isolation and biochemical characterisation of a bacteriocin–like substance produced by Bacillus amyloliquefaciens An6. **Journal of Global Antimicrobial Resistance** 3(4): 255–261.

Cherif, A., Rezgui, W., Raddadi, N., Daffonchio, D., and Boudabous, A. (2008). Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD110. **Microbiological Research** 163: 684–692.

Cladera-Olivera, F., Caron, G. R., and Brandelli, A. (2004). Bacteriocin–like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. **Letters in Applied Microbiology** 38: 251–256.

Das, S., Ward, L. R., and Burke, C. (2010). Screening of marine *Streptomyces* spp. for potential use as probiotics in aquaculture. **Aquaculture** 305: 32–41.

Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P. and Hill, C. (2012). Bacteriocin production: a probiotic trait? **Applied and Environmental Microbiology** 78(1): 1–6.

Embaby, A. M., Heshmat, Y., Hussein, A., Marey, H. S. (2014). A sequential statistical approach towards an optimized production of a broad spectrum bacteriocin substance from a soil bacterium *Bacillus* sp. YAS 1 strain. **The Scientific World Journal** vol. 2014, Article ID 396304.

FAO/WHO. (2006) Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. **FAO Food and Nutrition Paper**: 85.

Fishery Information Technology Center. (2017). Fisheries statistics of Thailand 2015. Technical paper No. 5/2017. Fishery Information Technology Center, Department of Fisheries, **Ministry of Agriculture and Cooperatives**: 9.

Fontana, L., Bermudez–Brito, M., Plaza–Diaz, J., Munoz–Quezada, S., and Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterization and evaluation of probiotics. **British Journal of Nutrition** 109: Suppl, S35–S50.

Gobi, N., Vaseeharan, B., Chen, J., Rekha, R., Vijayakumar, S., Anjugam, M., and Iswarya, A. (2018). Fish and Shellfish Im-

munology Dietary supplementation of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 improves growth performance, mucus and serum immune parameters, antioxidant enzyme activity as well as resistance against *Aeromonas hydrophila* in tilapia *Oreochromis mossambicus*. **Fish and Shellfish Immunology** 74: 501–508.

Guo, X., Li, D., Lu, W., Piao, X., and Chen, X. (2006) Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the *in vivo* effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. **Antonie Van Leeuwenhoek** 90: 139–146.

Hassaan, M. S., Soltan, M. A., Mohammady, E. Y., Elashry, M. A., El–haroun, E. R., and Davies, S. J. (2018). Growth and physiological responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fed dietary fermented sun flower meal inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus subtilis*. **Aquaculture** 495(June): 592–601.

Hwanhlem, N., Ivanova, T., Biscola, V., Choiset, Y., and Haertlé, T. (2017). Bacteriocin producing *Enterococcus faecalis* isolated from chicken gastrointestinal tract originating from Phitsanulok, Thailand: Isolation, screening, safety evaluation and probiotic properties. **Food Control** 78: 187–195.

Inatsu, Y., Kimura, K., and Itoh, Y. (2002). Characterization of *Bacillus subtilis* strains isolated from fermented soybean foods in Southeast Asia: Comparison with *B. subtilis* (natto) starter strains. **Japan Agricultural Research Quarterly** 36: 169–175.

Kim, O., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., Na, H., Park, S. C., Jeon, Y. S., Lee, J. H., Yi, H., Won, S., and Chun, J. (2012). Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species, (2012). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 62: 716–721.

Lee, S. G., and Chang, H. C. (2018). Purification and characterization of mejucin, a new bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* SN7. **LWT – Food Science and Technology** 87: 8–15.

Maisak, H., Jantrakajorn, S., Lukkana, M., and Wongtavatchai, J. (2013) Antibacterial activity of tannin from sweet chestnut wood against *Aeromonas* and *Streptococcal* pathogens of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **The Thai Journal of Veterinary Medicine** 43: 105–111.

Meidong, R., Doolgindachbaporn, S., Jamjan, W., Sakai, K., Tashiro, Y., Okugawa, Y., and Tongpim, S. (2017). A novel probiotic *Bacillus siamensis* B44v isolated from Thai pickled vegetables for potential use as a feed supplement in aquaculture. **The Journal of General and Applied Microbiology** 253: 246–253.

Meidong, R., Khotchanalekha, K., Doolgindachbaporn, S., Nagasawa, T., Nakao, M., Sakai, K., and Tongpim, S. (2018). Evaluation of probiotic *Bacillus aureus* B81e isolated from healthy hybrid catfish on growth, disease resistance and innate immunity of Pla–mong *Pangasius bocourti*. **Fish and Shellfish Immunology** 73: 1–10.

Nayak, S. K. (2010). Probiotics and immunity: A fish perspective. **Fish and Shellfish Immunology** 29(1): 2–14.

Newaj–Fyzul, A., and Austin, B. (2015). Probiotics, immunostimulants, plant products and oral vaccines, and their role as feed supplements in the control of bacterial fish diseases. **Journal of Fish Diseases** 38(11): 937–955.

O'Sullivan, L., Ross, R. P., and Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie** 84(5-6): 593–604.

Parente, E., Ricciardi, A., and Addario, G. (1994). Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology** 41: 388–394.

Regulation (EC), (2003) No 1831/2003 of the European parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. OJ L 268, 18.10. 2003, p.29. **Last amended by Regulation (EC)** No 386/2009, OJ L 118, 13.5.2009, p.66.

Salazar, F., Ortiz, A., and Sansinenea, E. (2017). Characterization of two novel bacteriocin-like substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149 with broad–spectrum antimicrobial activity. **Journal of Global Antimicrobial Resistance** 11: 177–182.

Scholz, R., Vater, J., Budiharjo, A., Wang, Z., He, Y., and Dietel, K. (2014). Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Journal of Bacteriology** 96: 1842–1852.

Smith, P. (2008) Antimicrobial resistance in aquaculture. **Revue Scientifique et Technique** 27: 243–264.

Tapia–Paniagua, S. T., Vidal, S., Lobo, C., Prieto–Álamo, M. J., Jurado, J., Cordero, H., Cerezuelad, R., García de la Bandab, I., Esteband, M. A., Balebonaa, M. C., and Moriñigoa, M.A. (2014). The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease. **Fish and Shellfish Immunology** 41(2): 209–221.

Tongpim, S., Meidong, R., Nontaso, N., and Doolgindachbaporn, S. (2009) Screening of lactic acid bacteria to be used as

probiotics in Tilapia fish. **The 3th International Conference on Fermentation Technology for Value added Agricultural Products.** Klangnanatham, Khon Kaen: 55.

Xia, Y., Lu, M., Chen, G., Cao, J., Gao, F., Wang, M., Liu, Z., Zhang, D., Zhu, H., and Yi, M. (2018). Effects of dietary *Lactobacillus rhamnosus* JCM1136 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM5805 on the growth, intestinal microbiota, morphology, immune response and disease resistance of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish and Shellfish Immunology** 76: 368–379.