การยึดเกาะและการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารบนเซลล์ Caco-2 ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ไอโซเลท PK3, PK5 และ PK6 ที่แยกได้จากผักกาดดอง

Adhesion Ability and Adhesion Inhibition of Bacterial Gastrointestinal Pathogens on Caco-2 Cell of Lactic Acid Bacteria PK3, PK5 and PK6 Isolated from Pickle

ณัฐกาญจน์ แดงมณี[1*] ณัฏฐณิชา รื่นชล[2] สุมนา ทองเนาวรัตน์[2] และ ณัฐหทัย รัตนสุขศรี[2]

Nattakan Dangmanee[1*] Nuttanicha Ruenchol[2] Sumana Tongnaowarat[2] and Nathathai Rattanasuksri [2]

[1]อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการแพทย์แผนตะวันออก วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ถนนพหลโยธิน ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

[2]นักศึกษาปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก มหาวิทยาลัยรังสิต ถนนพหลโยธิน ตำบลหลักหก อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

[1]Lecturer in Master of Science (Oriental Medicine) of Oriental Medicine College, Rangsit University, Phahonyothin Rd., Lak-hok, Patumtanee, Thailand 12000

[2] Graduate student in Bachelor of Science (Oriental Medicine) of Oriental Medicine College, Rangsit University, Phahonyothin Rd., Lak-hok, Patumtanee, Thailand 12000

[*]Corresponding author, E mail: nattakan.d@rsu.ac.th

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK3, PK5 และ PK6 ที่แยกได้จากผักกาดดองบนเซลล์ Caco-2 และการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK3, PK5 และ PK6 ใช้เป็นกลุ่มตัวอย่างในการทดสอบ โดยมีเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยคือ เซลล์ Caco-2 และเชื้อ Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) DMST 30546 ข้อมูลผลการทดลองที่ได้นำมาวิเคราะห์โดยใช้ ใช้ Student's *t* test ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK3 มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะบนเซลล์ Caco-2 ได้ดีที่สุด รองลงมาคือแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK6 และ PK5 ตามลำดับ และแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK5 สามารถยับยั้งการยึดเกาะของ EPEC DMST 30546 บนเซลล์ Caco-2 ได้ดีที่สุด

คำสำคัญ: *โพรไบโอติก แบคทีเรียกรดแลกติก แบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร*

มหาวิทยาลัยรังสิต

Abstract

The objective of this experiment was to study the adhesion ability of lactic acid bacteria PK3, PK5 and PK6 isolated from pickle on Caco-2 cell and the adhesion inhibition of bacterial gastrointestinal pathogens. Lactic acid bacteria PK3, PK5 and PK6 were used as tested samples. The materials also included Caco-2 cells and Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) DMST 30546. The results indicated that lactic acid bacteria PK3 showed the highest adhesion activity on Caco-2 cell, followed by lactic acid bacteria PK6 and PK5, respectively. Furthermore, lactic acid bacteria PK5 showed the highest inhibitory activity on Caco-2 cell.

Keywords: *Probiotic Lactic acid bacteria, Bacterial gastrointestinal pathogens*

1. บทนำ

ในปัจจุบันวิวัฒนาการทางวิทยาศาสตร์กับมนุษย์เรามีความก้าวหน้ามากขึ้น ทำให้ความรู้เกี่ยวกับสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ที่อาศัยในร่างกายมนุษย์ขยายวงกว้างขวางมาก การทดลองต่าง ๆ ทำให้ค้นพบความหลากหลายทางสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ ที่อาศัยในร่างกายมนุษย์ ทำให้ทราบว่าสิ่งใดที่เป็นประโยชน์หรือเป็นโทษต่อร่างกายของเรา รวมไปถึงสิ่งมีชีวิตกลุ่มเล็ก ๆ กลุ่มหนึ่งที่อาศัยอยู่ภายในร่างกายมนุษย์ คือ โพรไบโอติก

โพรไบโอติก เป็นอาหารเสริมที่เป็นจุลินทรีย์เล็ก ๆ ที่ยังมีชีวิตอาจจะเป็นชนิดเดี่ยวหรือชนิดผสม เมื่อบริโภคเข้าไปในปริมาณที่เพียงพอจะช่วยส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภคได้ดี โพรไบโอติกที่มีการค้นคว้าศึกษามากที่สุด คือ โพรไบโอติกในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสและแลกโตสให้เกิดเป็นกรดแลกติก ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ก่อให้เกิดโรคได้ (พนารัตน์ มอญใต้, 2555) โดยกลุ่มแบคทีเรียที่มีการนำมาผลิตเป็นโพรไบโอติกที่สำคัญคือ แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ดีที่จะให้คุณประโยชน์ต่อร่างกายได้มากที่สุด จะต้องมีคุณสมบัติที่เรียกได้ว่าเป็นโพรไบโอติกชนิดดี คือ ทนทานต่อสภาพที่มีกรดสูง มีความสามารถในการยึดเกาะเยื่อบุทางเดินอาหาร สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์และควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้ เป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีไม่เป็นสายพันธุ์ก่อโรค โดยหน้าที่หลักของจุลินทรีย์เมื่อเข้าสู่ภายในลำไส้จะมีหน้าที่หลัก 3 อย่าง คือ 1) ช่วยย่อยสลายและหมักสารอาหารให้กลายเป็นพลังงาน 2) ควบคุมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เนื้อเยื่อลำไส้ กระตุ้นให้ลำไส้เปลี่ยนสภาพ เพื่อให้ทำงาน ดูดซึมสารอาหารได้ดี ปรับเปลี่ยนไม่ให้เซลล์ภายในลำไส้กลายเป็นเซลล์มะเร็ง และ 3) ทำหน้าที่เป็นเกราะปกป้องร่างกายจากสิ่งแปลกปลอมโดยการแย่งเกาะที่ผนังลำไส้ ป้องกันไม่ให้เชื้อโรคผ่านเข้าไปได้ (อุทัย เก้าเอี้ยน, 2549)

จากคุณสมบัติที่ได้กล่าวมาข้างต้น “การยึดเกาะเยื่อบุในทางเดินอาหาร” เป็นคุณสมบัติเบื้องต้นประการหนึ่งที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ หากจุลินทรีย์ขาดหรือบกพร่องในคุณสมบัติด้านการยึดเกาะ จุลินทรีย์ชนิดที่สามารถก่อโรคได้จะเข้ามาเกาะแทนที่ และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดดีจะไม่เกิดขึ้น ทำให้คุณประโยชน์ของจุลินทรีย์ชนิดดีจะไม่เกิดขึ้นอย่างที่ควรจะเป็น การศึกษาการยึดเกาะเยื่อบุใน

ทางเดินอาหารของเชื้อที่จะจัดเป็นโพรไบโอติก จะทำการศึกษาการยึดเกาะเซลล์ลำไส้เล็ก ใช้เซลล์ Caco-2 เป็นตัวแทนของลำไส้เล็ก ซึ่งเซลล์ Caco-2 เป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ และสามารถเจริญเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่เป็นเซลล์ลำไส้เล็กได้ (Gopal et al., 2001) ผนังด้านในของเซลล์ลำไส้เล็ก เป็นเซลล์บุผิวชั้นเดียวมีส่วนที่ยื่นเล็ก ๆ คล้ายนิ้ว เรียกว่า วิลลัส (villus) และไมโครวิลลัส(microvillus) เมื่อไปถึงลำไส้เล็กโพรไบโอติกต้องเกาะติดกับ brush border ของ microvilli หรือยึดเกาะกับชั้นเยื่อบุผิว (mucus layer) โดยไม่ถูกปัดออกจากลำไส้จากการเคลื่อนไหวแบบ peristalsis (Merk et al., 2005) ซึ่งจุลินทรีย์ชนิดที่สามารถก่อโรคในทางเดินอาหารมีหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้โดยเฉพาะเชื้อในกลุ่ม *Escherichia coli* กลุ่มผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาการยึดเกาะบนเซลล์ Caco-2 ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK3, PK5 และ PK6 ที่แยกได้จากผักกาดดองและการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการยึดเกาะบนเซลล์ Caco-2 ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK3, PK5 และ PK6 ที่แยกได้จากผักกาดดอง

2. เพื่อศึกษาการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารโดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK3, PK5 และ PK6 ที่แยกได้จากผักกาดดอง

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แบคทีเรียและเซลล์

เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK3, PK5 และ PK6 แยกได้จากผักกาดดอง (นฤมล และคณะ, 2557)

เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารที่ใช้ได้แก่ Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) DMST 30546 ซื้อจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ประเทศไทย

เซลล์ Caco-2 (ATCC HTB 37™) ซื้อจาก the American Type Culture Collection

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การศึกษาการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK3, PK5 และ PK6 ที่แยกได้จากผักกาดดองบนเซลล์ Caco-2 (ดัดแปลงจาก Tuomola and Salminen, 1998)

เลี้ยงเซลล์ Caco-2 ในอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่มี L-glutamine, fetal bovine serum 20 เปอร์เซ็นต์, penicillin G 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ streptomycin sulfate 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมี CO_2 5 เปอร์เซ็นต์ นำเซลล์ Caco-2 ที่ได้ใส่ลงใน 24-well tissue culture plate ความเข้มข้นหลุมละ $4.5x10^5$ เซลล์ บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมี CO_2 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงเซลล์ Caco-2 เป็นเวลา 21 วัน ก่อนนำไปทดสอบการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ล้างเซลล์ Caco-2 ด้วย phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 จากนั้นเติมสารละลายของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกซึ่งอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ เข้มข้น 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ลงไปใน 24-well tissue culture plate ซึ่งมีเซลล์ Caco-2 หลุมละ 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมี CO_2 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างเชื้อแบคทีเรีย

มหาวิทยาลัยรังสิต

กรดแลกติกที่ไม่เกาะกับเซลล์ออกด้วย PBS pH 7.4 จำนวน 1 ครั้ง ทำการย่อยเซลล์ด้วยการเติม Triton X-100 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมี CO_2 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที และนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่เกาะโดยวิธี plate counting บนอาหาร Man Rogosa and Sharpe (MRS) agar และคำนวณหาร้อยละการยึดเกาะตามสมการข้างล่าง

การยึดเกาะ (%) = (N_1/N_0) x 100%

N_1 คือ จำนวนเชื้อที่ยึดเกาะ

N_0 คือ จำนวนเชื้อที่เติม

3.2.2 การศึกษาการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารบนเซลล์ Caco-2 โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK3, PK5 และ PK6 ที่แยกได้จากผักกาดดอง (ดัดแปลงจาก Matijašić et al., 2006)

การทดสอบการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร (Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) DMST 30546) ล้างเซลล์ Caco-2 ด้วย PBS pH 7.4 และแบ่งการทดสอบเป็น 3 วิธี ดังนี้

การแย่งกันยึดเกาะ (competition) เติมสารละลายของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกและแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารเข้มข้น 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ลงไปใน 24-well tissue culture plate ซึ่งมีเซลล์ Caco-2 หลุมละ 1 มิลลิลิตร (แบคทีเรียกรดแลกติก 0.5 มิลลิลิตรและแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร 0.5 มิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมี CO_2 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

การยึดเกาะและครอบครองเซลล์ก่อน (exclusion) เติมสารละลายของเชื้อแบคทีเรียแลกติกเข้มข้น 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ลงไปใน 24-well tissue culture plate ซึ่งมีเซลล์ Caco-2 หลุมละ 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมี CO_2 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลายของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารเข้มข้น 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร หลุมละ 0.5 มิลลิลิตร บ่มต่อที่สภาวะเดิมอีก 30 นาที

การแทนที่การยึดเกาะ (displacement) เติมสารละลายของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารเข้มข้น 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ลงไปใน 24-well tissue culture plate ซึ่งมีเซลล์ Caco-2 หลุมละ 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมี CO_2 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลายของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกเข้มข้น 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร หลุมละ 0.5 มิลลิลิตร บ่มต่อที่สภาวะเดิมอีก 30 นาที

ทั้ง 3 วิธีนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารที่เกาะโดยวิธี plate counting บนอาหาร MacConkey agar และคำนวณหาร้อยละการยึดเกาะ

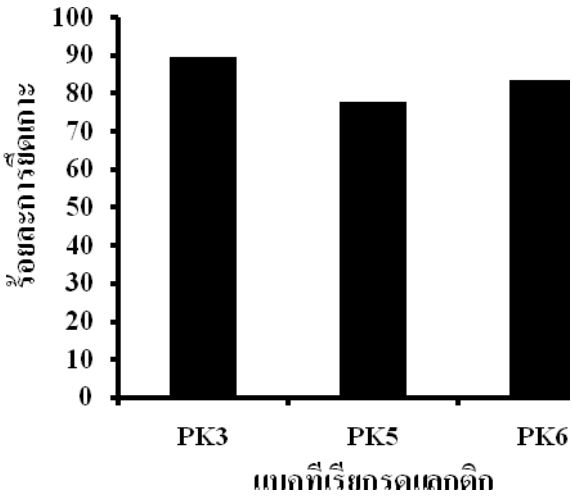
3.3 วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลผลการทดลองจะแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยใช้ Student's *t* test ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม ซึ่งผลการทดลองจะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $p < 0.05$

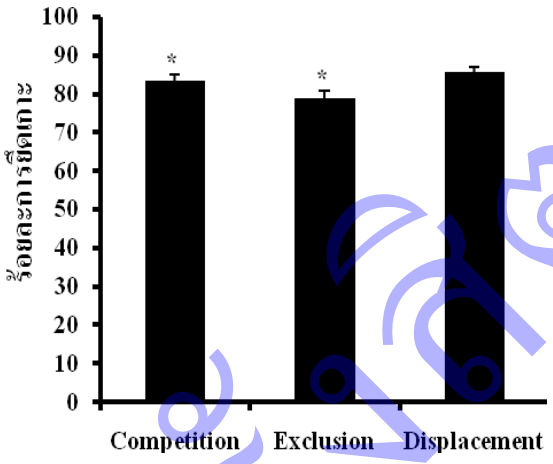
4. ผลการวิจัย

4.1 การยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK3, PK5 และ PK6 ที่แยกได้จากผักกาดดองบนเซลล์ Caco-2

เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK3, PK5 และ PK6 เกาะบนเซลล์ Caco-2 โดยมีร้อยละการยึดเกาะเท่ากับ 89.5, 77.8 และ 83.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงร้อยละการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK3, PK5 และ PK6 บนเซลล์ Caco-2



รูปที่ 2 แสดงร้อยละการยึดเกาะของเชื้อ EPEC DMST 30546 บนเซลล์ Caco-2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK3, * ค่าร้อยละการยึดเกาะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับร้อยละการยึดเกาะของเชื้อ EPEC DMST 30546 อย่างเดียว

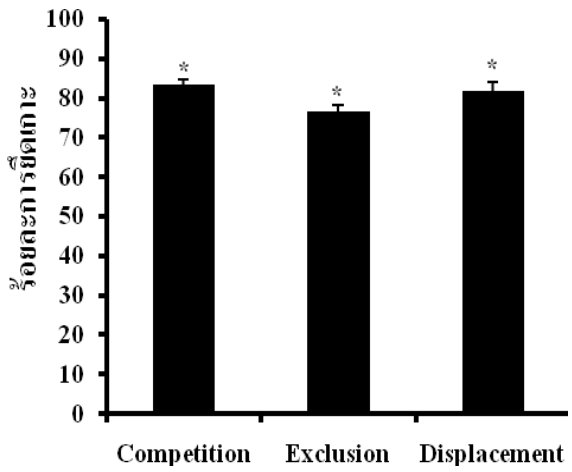
4.2 การยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ EPEC DMST 30546 บนเซลล์ Caco-2 โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK3

จากผลการทดลองพบว่า เชื้อ EPEC DMST 30546 ยึดเกาะบนเซลล์ Caco-2 ร้อยละ 86.0 ในวิธีการแย่งกันยึดเกาะ เชื้อ EPEC DMST 30546 ยึดเกาะบนเซลล์ Caco-2 ร้อยละ 83.6 การยึดเกาะลดลงอย่างมีนัยสำคัญคือ ลดลงจากเดิมร้อยละ 2.4 วิธีการยึดเกาะและครอบครองเซลล์ก่อน เชื้อ EPEC DMST 30546 ยึดเกาะร้อยละ 79.0 การยึดเกาะลดลงจากเดิมอย่างมีนัยสำคัญร้อยละ 7.0 และในวิธีการแทนที่การยึดเกาะ เชื้อ EPEC DMST 30546 ยึดเกาะร้อยละ 85.6 ลดลงจากเดิมเพียง 0.4 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 2)

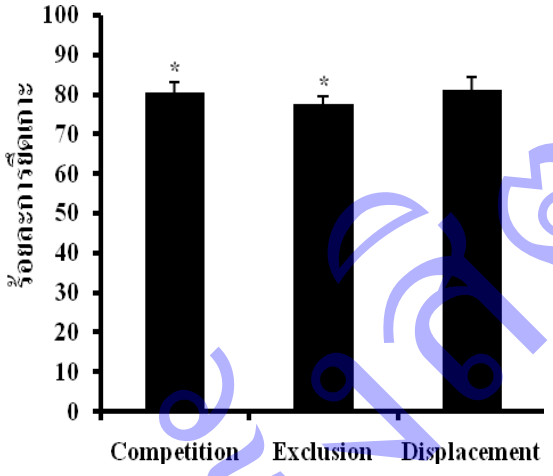
4.3 การยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ EPEC DMST 30546 บนเซลล์ Caco-2 โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK5

จากผลการทดลองพบว่า วิธีการแย่งกันยึดเกาะ ปริมาณของเชื้อ EPEC DMST 30546 ที่ใช้ทดสอบลดลงอย่างมีนัยสำคัญจากร้อยละ 86.0 เหลือ 83.4 วิธีการยึดเกาะและครอบครองเซลล์ก่อน จำนวนเชื้อที่ใช้ทดสอบลดลงอย่างมีนัยสำคัญจากร้อยละ 86.0 เหลือ 76.8 และวิธีการแทนที่การยึดเกาะ เชื้อที่ใช้ทดสอบลดลงอย่างมีนัยสำคัญจากร้อยละ 86.0 เหลือ 81.8 (รูปที่ 3)

มหาวิทยาลัยรังสิต



รูปที่ 3 แสดงร้อยละการยึดเกาะของเชื้อ EPEC DMST 30546 บนเซลล์ Caco-2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK5, * ค่าร้อยละการยึดเกาะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับร้อยละการยึดเกาะของเชื้อ EPEC DMST 30546 อย่างเดียว



รูปที่ 4 แสดงร้อยละการยึดเกาะของเชื้อ EPEC DMST 30546 บนเซลล์ Caco-2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK6, * ค่าร้อยละการยึดเกาะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับร้อยละการยึดเกาะของเชื้อ EPEC DMST 30546 อย่างเดียว

4.4 การยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ EPEC DMST 30546 บนเซลล์ Caco-2 โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK6

จากผลการทดลองพบว่า วิธีการแย่งกันยึดเกาะ เชื้อ EPEC DMST 30546 มีร้อยละการยึดเกาะลดลงอย่างมีนัยสำคัญจาก 86.0 เหลือ 80.6 วิธีการยึดเกาะและครอบครองเซลล์ก่อน การยึดเกาะลดลงอย่างมีนัยสำคัญจากร้อยละ 86.0 เหลือ 77.6 และวิธีการแทนที่การยึดเกาะ ลดลงจากร้อยละ 86.0 เหลือ 81.3 (รูปที่ 4)

5. การอภิปรายผล

5.1 การยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK3, PK5 และ PK6 ที่แยกได้จากผักกาดดองบนเซลล์ Caco-2

จากผลการทดลองพบว่า เชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกที่ดี คือ สามารถยึดเกาะกับเซลล์ลำไส้เล็กที่ใช้ทดสอบ โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK3 มีร้อยละการยึดเกาะบนเซลล์ Caco-2 ได้ดีที่สุดเท่ากับร้อยละ 89.53 รองลงมาคือ เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK6 และ PK5 ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลกติก PK3 มีคุณสมบัติในการยึดเกาะดีกว่าเชื้อ *Lactobacillus paraplantarum* FT259 ที่แยกได้จากชีสกึ่งแข็งของชาวบราซิล (Tulini et al., 2013) โดยทำการศึกษาการยึดเกาะบนเซลล์ Caco-2 และผลการทดสอบพบว่าเชื้อ *L. paraplantarum* FT259 มีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะบนเซลล์ Caco-2 เพียง 74 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการยึดเกาะเซลล์ Caco-2 ของเชื้อ

มหาวิทยาลัยรังสิต

Lactobacilli ที่แยกได้จากมะกอกหมักของโปตุเกส (Peres et al., 2014) ผลการทดลองพบว่า *L. plantarum* 33 มีความสามารถในการยึดเกาะได้ดีที่สุดและมีเปอร์เซ็นต์การยึดเกาะเพียง 15.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกลไกการยึดเกาะของแบคทีเรียกรดแลกติก สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งแบบจำเพาะ (receptor-specific blind) แบบใช้แรงวาลเดอวาลล์ (Val der Waals force) แบบใช้ประจุ (charge) และการจับกันของเซลล์กับตัวรับโดยการมีปฏิสัมพันธ์แบบไม่ชอบน้ำ (hydroprobic interaction) ซึ่งโดยทั่วไปผนังเซลล์ของแบคทีเรียจะมีลักษณะ cell surface hydrophobicity มีผลทำให้ผิวเซลล์ไม่ชอบน้ำ นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถสร้างโปรตีนบางชนิดออกมาบนผนังเซลล์ ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่ม extracellular matrix molecules เช่น collagen, fibronectin และ vitronectin โดยโปรตีนเหล่านี้จะยึดเกาะกับเยื่อเมือกบนผนังลำไส้ได้ (ณัฐพัฒน์ เสาะสมบูรณ์, 2554)

5.2 การศึกษาการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารบนเซลล์ Caco-2 โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK3, PK5 และ PK6 ที่แยกได้จากผักกาดดอง

จากผลการทดลองพบว่า วิธีการยึดเกาะและครอบครองเซลล์ก่อน (exclusion) สามารถลดการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้มากที่สุด รองลงมาคือวิธีการแย่งกันยึดเกาะ (competition) และการแทนที่การยึดเกาะ (displacement) ตามลำดับ โดยแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุด คือ เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK5 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ *Shigella sonnei* บนเซลล์ HT-29 โดยใช้ Lactobacilli จากอาหารหมักของจีน ทำการทดสอบ 3 วิธีคือ การแย่งกันยึดเกาะ การยึดเกาะและครอบครองเซลล์ก่อน และการแทนที่การยึดเกาะ ผลการทดลองพบว่า วิธีการยึดเกาะและครอบครองเซลล์ก่อนเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคที่ทดสอบ มากที่สุด โดยมีเชื้อ Lactobacilli 3 สายพันธุ์คือ *L. paracasei* subsp. *paracasei* M5-L, *L. rhamnosus* J10-L และ *L. casei* Q8-L ที่สามารถยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคได้ นอกจากนี้ *L. paracasei* subsp. *paracasei* M5-L ยังเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคในทุกวิธีการทดสอบ (Zhang et al., 2010)

6. บทสรุป

จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK3 มีประสิทธิภาพในการยึดเกาะบนเซลล์ Caco-2 ได้ดีที่สุด ในส่วนการยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร EPEC DMST 305346 พบว่า การทดลองด้วยวิธีการยึดเกาะและครอบครองเซลล์ก่อน เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารได้ดีที่สุด โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลท PK5 มีประสิทธิภาพในยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุด

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับคุณสมบัติเบื้องต้นที่สำคัญในการเป็นโพรไบโอติกที่ดี คือ คุณสมบัติการยึดเกาะเยื่อบุทางเดินอาหาร การยับยั้งและควบคุมเชื้อก่อโรค นั่นคือ จุลินทรีย์โพรโบโอติกที่จะสามารถรักษาหรือป้องกันการเกิดโรคได้ดีจำเป็นต้องมีคุณสมบัติการ ยึดเกาะเยื่อบุทางเดินอาหารที่มีประสิทธิภาพ

7. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต ประจำปีการศึกษา 2557

มหาวิทยาลัยรังสิต

8. เอกสารอ้างอิง

ณัฐพัฒน์ เสาะสมบูรณ์. (2554). การประเมินสมบัติเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นและการห่อหุ้มแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากทางเดินอาหารไก่. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.

นฤมล ชุ่มแก้ว, รุจิรา มั่นขัน และ จริยา บุญสอน. (2557). การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากผักกาดดอง. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต, สาขาการแพทย์แผนตะวันออก วิทยาลัยการแพทย์แผนตะวันออก, มหาวิทยาลัยรังสิต ปทุมธานี.

พนารัตน์ มอญใต้. (2555). เรื่องน่ารู้เกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่เป็นมิตร: โปรไบโอติก (Probiotics). วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ. 60: 13-15.

อุทัย เก้าเอี้ยน. (2549). โปรไบโอติก. สงขลานครินทร์เวชสาร. 24: 315-323.

Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J. & Gill, H.S. (2001). *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. Int. J. Food Microbiol. 67: 207-216.

Matijašić, B.B., Narat, M., Peternel, M.Z. & Rogelj, I. (2006). Ability of *Lactobacillus gasseri* K7 to inhibit *Escherichia coli* adhesion *in vitro* on Caco-2 cells and *ex vivo* on pigs' jejunal tissue. Int. J. Food Microbiol. 107: 92-96.

Merk, K., Borelli, C. & Korting, H.C. (2005). *Lactobacilli*-bacteria-host interactions with special regard to the urogenital tract. Int. J. Med. Microbiol. 295: 9-18.

Peres, C.M., Alves, M., Hernandez-Mendoza, A., Moreira, L., Silva, S., Bronze, M.R., Vilas-Boas, L., Peres, C. & Malcata, F.X. (2014). Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive aspotential probiotics. LWT- Food Sci. Technol. 59: 234-246.

Tulini, F.L., Winkelströter, L.K. & De Martinis, E.C.P. (2013). Identification and evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus paraplantarum* FT259, a bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian semi-hard artisanal cheese. Anaerobe 22: 57-63.

Tuomola, E.M. & Salminen, S.J. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. Int. J. Food Microbiol. 41: 45-51.

Zhang, Y.C., Zhang, L.W., Tuo, Y.F., Guo, C.F., Yi, H.X. & L,i .JY. (2010). Inhibition of *Shigella sonnei* adherence to HT-29 cells by lactobacilli from Chinese fermented food and preliminary characterization of S-layer protein involvement. Res. Microbiol. 161: 667-672.

มหาวิทยาลัยรังสิต