

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์

1.1 แบคทีเรียกรดแลกติก

แบคทีเรียกรดแลกติกที่ใช้ทดสอบการผลิตสารยับยั้งจำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท MS-1, MG-2, PR-2, IG-3, IG-5, IG-8 และ IFS-1 ได้รับจากพรทิพย์ เสริมพงษ์พันธ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา สำหรับแบคทีเรียกรดแลกติก ไอโซเลท MS-1, PR-2 และ MG-2 แยกได้จาก แหนม ไอโซเลท IG-3, IG-5 และ IG-8 แยกได้จากไส้ไก่ และไอโซเลท IFS-1 แยกได้จากไส้ปลา แบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 7 ไอโซเลทได้ผ่านการทดสอบแล้วว่า สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Escherichia coli* และ *Salmonella* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคได้

1.2 แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ

แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบจำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium DMST 16809, *Salmonella* Welteureden PTS1085/04, *Salmonella* sp. 2, *Escherichia coli* ATCC 8739 และ *Escherichia coli* O157:H7 DMST 12743, *Enterococcus faecalis* TISTR379 สำหรับแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella* Enteritidis SOO3 และ *Staphylococcus aureus* 32D ได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร.สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 แบคทีเรียโปรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษาผลต่อการเจริญของไก่กระตัง

แบคทีเรียกรดแลกติก 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท PR-2, MG-2, IFS-1 และ IG-3 สำหรับเชื้อ *Clostridium* sp. ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.ปราโมทย์ ศิริโรจน์ เชื้อ *Bacillus* sp. และยีสต์ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.วรรณ มาลาพันธุ์

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

3. สารเคมีทั่วไป

- 3.1 Dipotassiumhydrogenphosphate (Merck)
- 3.2 Potassiumdihydrogenphosphate (Merck)
- 3.3 Tween 80 (บริษัท lab centre 1992 จำกัด)
- 3.4 Magnesiumphosphate (AJAX Chemicals)
- 3.5 Manganese phosphate (SPS Finechem)
- 3.6 Ammonium citrate (May&Baker LTD)
- 3.7 Sodium acetate (Merck)
- 3.8 Yeast extract (Difco)
- 3.9 Peptone (Merck)
- 3.10 Beef extract (Merck)

4. เครื่องมือ

- 4.1 เครื่องชั่ง (balance)
- 4.2 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)
- 4.3 เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
- 4.4 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- 4.5 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- 4.6 เครื่องเซนตริฟิวส์ (centrifuge)
- 4.7 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 4.8 เครื่องวัดค่าความดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- 4.9 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 4.10 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- 4.11 เตาไมโครเวฟ (microwave)
- 4.12 ไมโครปิเปต (micro pipette)
- 4.13 ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)

4.14 เครื่องแก้วที่จำเป็นในการวิเคราะห์

วิธีการ

1. การตรวจสอบการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์

1.1 การตรวจสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar spot test

การทดสอบคัดแปลงจากวิธีของ ชลัทและคณะ (2542) เชื้อเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งเชื้อลงบนจานอาหารวุ้น MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเททับด้วยอาหารกึ่งแข็ง TSA (agar 0.7 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่กำลังหลอมอยู่ที่อุณหภูมิ 47-50 องศาเซลเซียส และผสมด้วยเชื้อทดสอบที่มีความเข้มข้นประมาณ 10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการยับยั้งจากบริเวณใสรอบๆโคโลนี นำเชื้อที่ให้ผลการยับยั้งไปทำการทดสอบด้วยวิธีอื่นต่อไป

1.2 การตรวจสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยวิธี Agar well diffusion

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่ให้ผลบวกจากการทดสอบขั้นต้น ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกเซลล์ออกโดยนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกเอาเซลล์ออก นำสารละลายใสปราศจากเซลล์ที่ได้มาทำการปรับพีเอชเป็น 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5.0 โมลาร์ เตรียมเชื้อสำหรับทดสอบ โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเหลว TSB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใช้ไมโครปิเปตดูดเชื้อทดสอบ 10 ไมโครลิตร เติมนลงในอาหารกึ่งแข็ง TSA ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ที่หลอมเหลวอยู่ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันแล้วเททับบนอาหารแข็ง NA หรือ TSA ที่ประกอบด้วยวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ให้แข็งตัว ใช้ cork borer ที่ปลอดเชื้อเจาะวุ้นให้เป็นหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้จากการเตรียมในขั้นต้นมาหยอดลงในหลุมที่เจาะไว้ หลุมละ 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยสังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆหลุมแล้ววัดขนาดและบันทึกผล

2. การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติก

ทำการจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกที่ต้องการจัดจำแนกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน สรีระวิทยา การจัดเรียงตัวของเซลล์ และตรวจสอบความสามารถการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการปรับอุณหภูมิ และความเข้มข้นของเกลือระดับต่างๆ การทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่าง(pH) การผลิตเอนไซม์อะตาเลส(catalase) และการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์(CO₂) จากน้ำตาลกลูโคส วิธีการทดสอบดังกล่าวผนวก ข การจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA ได้ส่งให้กับหน่วยบริการจัดจำแนกแบคทีเรีย หน่วยปฏิบัติการ KU-Vector ศูนย์พัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีรัฐร่วมเอกชน(สรอ.) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ เป็นผู้ทำการจัดจำแนก

3. การศึกษาสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้เพื่อนำมาใช้เป็นโปรไบโอติก

3.1 การทดสอบความทนทานต่อสภาพความเป็นกรดและด่างของจุลินทรีย์

การทดสอบความทนทานต่อสภาพความเป็นกรดและด่าง ของจุลินทรีย์ เนื่องจากภายในระบบทางเดินอาหารของไก่มีความเป็นกรดและด่าง ในส่วนต่างๆของระบบทางเดินอาหารแตกต่างกัน โดยในกระเพาะอาหารของไก่มีสภาวะความเป็นกรดสูง ขณะที่ในลำไส้มีทั้งสภาวะที่เป็นกรดและด่าง ดังนั้นการจะนำจุลินทรีย์ไปใช้ในไก่ จึงควรมีการทดสอบความทนทานต่อสภาพความเป็นกรดและด่างของจุลินทรีย์ก่อนนำไปใช้จริง ทำการทดสอบโดยถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ปรับพีเอชเป็น 2, 3, 7, 8 และ 9 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 8 นอร์มอล และโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) ความเข้มข้น 5 นอร์มอล โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 เพอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการเจริญโดยวิธี pour plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองเป็น log CFU/ml

3.2 การทดสอบความทนทานต่อน้ำดี(bile)

การทดสอบความทนทานต่อน้ำดี(bile) เนื่องจากในลำไส้ของไก่มีการหลั่งน้ำดีออกมาจากตับ(liver) เพื่อมาย่อยอาหารประเภทไขมันให้มีโมเลกุลเล็กลง ดังนั้นน้ำดีจึงเป็นสารมีอันตรายต่อผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ซึ่งมีไขมันเป็นส่วนประกอบ จึงต้องมีการทดสอบความทนทานต่อน้ำดีของจุลินทรีย์ก่อนนำไปใช้จริง ทำการทดลองโดยถ่ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีการเติมน้ำดีที่แยกได้จากไก่ ความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญด้วยวิธี pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองเป็น log CFU/ml

3.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และผลิตรวดของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติก และสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค ก่อนที่จะนำไปทดสอบการอยู่รอดในลำไส้ไก่ ต้องทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และผลิตรวด เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับนำไปใช้เพิ่มปริมาณการผลิตในลำไส้ต่อไป ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหารเหลว MRS โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, 42 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อ วัดการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ และหาเปอร์เซ็นต์กรดที่แบคทีเรียสร้างขึ้นทุก 4 ชั่วโมง นำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงการเจริญเพื่อหาอุณหภูมิที่มีการเจริญ และผลิตรวดสูงสุด

4. การศึกษาผลการเสริมโปรไบโอติกในรูปเชื้อสดต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่ กระตัง

การศึกษาผลการเสริมแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์เป็นโปรไบโอติกในรูปเชื้อสดต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่กระตัง โดยนำแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้ไปให้ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ ทำการทดสอบคุณลักษณะทางการเจริญเติบโต เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับการเสริมสารปฏิชีวนะ (Avilamycin) โปรไบโอติกทางการค้า และโปรไบโอติกในรูปเชื้อผสม ซึ่งประกอบด้วยเชื้อยีสต์, *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. และแบคทีเรียกรดแลคติก (*Enterococcus faecium* PR-2 และ *Lactobacillus plantarum* IFS-1) ในอัตราส่วน 1: 1: 1: 1 สำหรับการทดลองนี้ไก่ทดลองแต่ละกลุ่มจะได้รับโปรไบโอติกในน้ำดื่มความเข้มข้น 10^6 CFU/ml ตั้งแต่อายุ 1 วัน จนกระทั่งอายุครบ 42 วัน ในระหว่างการทดลองได้ทำการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ก่อนผสม และหลังผสมน้ำดื่มให้ไก่ทุกวัน เพื่อเป็นการยืนยันว่าโปรไบโอติกที่ใช้มีความเข้มข้นตามที่ต้องการ ในวันที่ 7, 21, 28, 35 และ 42 ของการทดลอง สุ่มไก่จากแต่ละกลุ่มการทดลองมาวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้ส่วนไอลิเทียม(ileum) และซีกัม(cecum)

4.1 การเตรียมตัวอย่าง สุ่มไก่จาก 8 กลุ่มการทดลอง จำนวน 4 ซ้ำ ๆ ละ 1 ตัว รวมเป็นจำนวน 32 ตัวอย่างต่อสัปดาห์ แยกใส่ไถ่ส่วนไอลิเทียมและซีกัม จากแต่ละตัวอย่างมาทำการทดลองโดยมัดแยกผูกส่วนปลายไส้ด้วยด้ายไนลอน เพื่อไม่ให้สารที่อยู่ภายในไหลออกมาข้างนอก และป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่อยู่ภายนอก ทำการล้างไถ่ส่วนนอก 2 ครั้งด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อตัดไถ่จนได้น้ำหนักที่ต้องการ แล้วใช้กรรไกรตัดผ่ากลางไถ่ เติมน้ำสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ลงไปทำการเจือจางให้มีความเจือจาง 1:10 นำไปเข้าเครื่องตีปั่นอาหาร(stomacher) นาน 1 นาที

4.2 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ในไถ่ไก่ นำตัวอย่างไถ่ส่วนไอลิเทียม และซีกัม จากข้อ 4.1 มาทำการเจือจางต่อไปด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จนมีระดับความเจือจางที่ต้องการคือ $1:10^2 - 1:10^8$ ทำการตรวจนับเชื้อ *E. coli* โดยวิธีการ spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB แล้วตรวจนับโคโลนีที่มีลักษณะเป็น green metallic sheen สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติก ทำการตรวจนับจำนวนโดยใช้วิธีการ pour plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีการเติม

แคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองเป็น log CFU/ml

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน(Analysis of variance) ในแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) (Gill, 1978) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม โดยวิธี Duncan's new multiple range test (Duncan, 1955) โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SAS (SAS, 1996) ในการทดลองที่ 4

6. สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ

7. ระยะเวลาการวิจัย

เริ่มวิจัยตั้งแต่เดือนมกราคม 2547 จนถึงเดือนกันยายน 2549