

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

กล้องจุลทรรศน์ (Microscope,, NIKON)

ตู้อบเชื้อ (Incubator, BINDER)

เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance; 4 digits, CP 22 4S/SARTORIUS)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrophotometer, HP HEWELLT PACKARD)

ตู้เชื้อเชื้อ(Microbiological Cabinet, MARK II /DWYER)

เตาให้ความร้อนพร้อมแท่งแก้วคน(Hot Plate/ Magnetic Stirrer, WSAH2/WELLAB MODEL)

หม้อไอน้ำฆ่าเชื้อความดัน (Autoclave, HVE-50/HIRAYAMA และ LABO/SUNYO)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, EUTECH INSTRUMENTS)

ตู้อบความร้อนแห้ง(Hot Air Oven, 100-800/OVER MEMRET)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath, MEMRET)

เครื่องเขย่าสาร (vortex)

1. เครื่องแก้ว

หลอดทดลอง(Test tube)

จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri Dish หรือ Plate)

สไลด์และกระจกปิดสไลด์

แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader)

ขวดรูปชมพู่ (Flask)

ปิเปต (Popette) & ออโต้ปิเปต (Autopipette)

แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)

บีกเกอร์ (Beaker)

2. เบ็ดเตล็ด

ตะกร้า (Basket)

ไครโอทิวป์ (Cryotube)

ทิป (Micropipette Tip)

ไมโครปิเปต (Micropipette)

ไม้พันสำลี (Cotton Bud)

ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test Tube Rack)

ไม้บรรทัด (Ruler)

กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ (Aluminum Foil)

กรรไกร (Scissors)

ผ้าก๊อต (Bandage)

หลอดเอฟเฟนดอร์ฟ (Eppendorf Tube)

กระดาษกรอง (Filter paper) เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตร

ปากคีบ (Forceps)

แท่งลวดเย็บเข็มและห่วงเย็บเข็ม (Loop and Needle)

สำลี (Cotton Wool)

วงแหวนอะลูมิเนียมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

MRS Broth (de Man Rogosa & Sharpe, HIMEDIA)

MRS Agar (HIMEDIA)

Milk Agar (HIMEDIA)

Starch Agar (HIMEDIA)

Bile Salt V (HIMEDIA)

Tributyrin Agar (HIMEDIA)

NA (Nutrient Agar, HIMEDIA)

Brain Heart Infusion Agar (HIMEDIA)

api[®] 50CHL Medium (biomerieux)

4. สารเคมี

Nacal 0.9 % (Sodium Chloride 0.9%)

Bromocresol Purple

1 N HCL (1 N Hydrochloric Acid)

1 N NaOH (1 N Sodium Hydroxide)

สารละลาย I₂ (Iodine Solution)

สารละลาย 3% H₂O₂ (3%Hydrogen Peroxide Solution)

สีย้อมแกรม (Gram Stain)

แอลกอฮอล์ 95 % (Alcohol 95 %)

เลนส์ใช้น้ำมัน (Oil Immersion Lens)

1. เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922
2. เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
3. เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
4. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ATCC 11778
5. เชื้อยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028
6. ยาต้านแบคทีเรีย Gentamicin (ชุดควบคุม)
7. ยาต้านเชื้อรา Amphotericin B (ชุดควบคุม)
8. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) 10 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง
9. อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) 9 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง
10. อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) 10 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง
11. อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose broth (SDB) 9 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง
12. MacFarland No. 0.5
13. น้ำยาล้างเชื้อ

3.2 วิจัย

ขออนุญาตการใช้สัตว์ทดลอง จากกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ใช้สถานที่เก็บตัวอย่างจากปางช้างแม่สา อ.แมริม จ.เชียงใหม่และใช้ห้องปฏิบัติการของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต.สุเทพ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ เป็นสถานที่ทำการวิจัย โดยมีวิธีการดำเนินการวิจัยดังนี้

ขั้นตอนการศึกษา

1. การ ศึกษาเอกสารทางวิชาการและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2. การศึกษาเพื่อคัดกรองจุลินทรีย์จากมูลช้าง

2.1 ตัวอย่างมูลช้าง

2.1.1 เก็บตัวอย่างมูลช้าง ไม่จำกัดเพศ จำนวน 27 ตัวอย่าง จาก ปางช้างแม่สา อ.แมริม จังหวัดเชียงใหม่

2.1.2 การคัดเลือกช้าง โดยคณะแพศ ไม่จำกัดอายุ มีข้อมูลและประวัติในการถ่ายพยาธิประจำปี มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงขณะเก็บตัวอย่าง มีการเก็บข้อมูลพื้นฐานประจำตัวสัตว์ ประเภท

ของการใช้งาน อาหารที่ได้รับ รวมทั้งชนิดและปริมาณ สัดส่วนอาหารชนิดต่างๆ จำนวนมื้อที่ให้เป็นประจำ (ให้ต่อเนื่องในลักษณะเดียวกันหรือมีการปรับเปลี่ยนอาหารมาแล้ว อย่างน้อย 1 สัปดาห์) มีการพิจารณาระยะหยุดยาก่อนอย่างน้อย 7 วัน การเก็บตัวอย่างในกรณีได้รับยาปฏิชีวนะ และต้องสามารถเก็บตัวอย่างได้อย่างปลอดภัย

2.1.3 ทำการล้างเก็บทางทวารหนัก โดยสวมถุงมือล้างที่เปลี่ยนใหม่ทุกครั้งและมีการใช้พาราฟินเหลวในการหล่อลื่น ในกรณีที่ล้างเก็บผ่านทางทวารหนักไม่ได้ ให้เก็บอุจจาระที่สดใหม่ทันทีที่ตกลงพื้นจากนั้น เก็บประมาณ 25 กรัม บรรจุในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ ปิดรัดปากถุง ขนส่งมาห้องปฏิบัติการภายในเวลา 1 ชั่วโมง

2.1.4 การเพาะแยกเชื้อจุลินทรีย์จากอุจจาระ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อคัดกรองเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก โดยเลี้ยงในอาหารสามชนิด คือ Plate Count Agar (PCA), Potato Dextrose Agar (PDA) และ MRS agar จากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติในขั้นต่อไป

3. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ การคัดกรองจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก โดยการทดสอบคุณสมบัติดังต่อไปนี้

3.1 การทนต่อกรด ต่าง (ดัดแปลงจาก Chou and Weimer, 1999 ; Halm et al., 2004)

การทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดเบส ทำได้โดย นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดในอาหารเหลว MRS ปรับค่าความเป็นกรดเบส ให้ได้เท่ากับ 2,3,4,5,ปกติ (7.4),8 และ 9 ตามลำดับ ด้วย 1N HCL และ 1NaOH ทำ 3 ซ้ำ บ่มที่เชื้อ 37 องศา เซลเซียสเป็น เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยดูความขุ่น ของอาหารเหลว ด้วย spectrophotometry OD₆₆₀ (ความยาวคลื่น 660) ที่ 0 และ 24 ชั่วโมงของการบ่ม (Toit และคณะ , 1998)

3.2 การทนต่อเกลือน้ำดี (ดัดแปลงจาก Chou and Weimer, 1999)

โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มา streak ลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีความเข้มข้น ของเกลือ น้ำดี ร้อยละ 0.30 (w/v) โดยการ streak plate ละ 4 เชื้อ ทำ 2 ซ้ำ บ่มไว้ที่ 37 องศา เซลเซียส เป็น เวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจดูการเจริญของเชื้อบนผิวหน้าอาหาร (Conway และ คณะ, 1987, Toit และคณะ , 1998)

3.3 การย่อยโปรตีน ไขมัน แป้ง (ดัดแปลงจาก Duangjitcharoen, et.al., 2008)

การทดสอบการย่อยโปรตีน

การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีนทำได้โดย นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS จนมีอายุครบ 18 ชั่วโมง มา Steak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Milk agar

นำไปป้อนไว้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ถ้ามีการย่อยโปรตีนจะเกิดวงใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อ

การทดสอบการย่อยไขมัน

การทดสอบความสามารถในการย่อยไขมันทำได้โดย นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS จนมีอายุ 18 ชั่วโมง มา Streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เติม tributyrin ความเข้มข้นร้อยละ 1 ทำ 3 ซ้ำ แล้วนำไปป้อนไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ถ้ามีการใช้ไขมันจะเกิดวงใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อ

การทดสอบการย่อยแป้ง

การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งทำได้โดย นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS จนมีอายุ 18 ชั่วโมงมา Streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar ทำซ้ำ นำไปป้อนไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทดสอบการย่อยแป้ง โดยการหยดสารละลาย ไอโอดีนลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้ามีการย่อยแป้งสีของอาหารจะไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

3.4 ความสามารถในการเจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้มา streak ลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีความเข้มข้น 1.5 % บ่มในตู้ 5%CO₂ (CO₂ incubator) เป็นเวลา 2-3 วัน ที่อุณหภูมิ 35-37°C.

3.5 ฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค (ดัดแปลงจาก Sililun, 2005)

วิธีทดลอง

1. กรองน้ำเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบผ่าน Membrane filter ขนาด 0.45 µm เพื่อกรองแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากน้ำเลี้ยงเซลล์
2. นำน้ำเลี้ยงเซลล์ที่แยกจากเซลล์แบคทีเรียมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและยีสต์ทดสอบ ดังนี้

เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922 เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ATCC 11778 และเชื้อยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028 โดยวิธี Agar cup plate

3. เพาะเลี้ยงแบคทีเรียและยีสต์ทดสอบในอาหาร Trypticase soy broth (TSB) และ Sabouraud dextrose broth (SDB) ตามลำดับ เป็นเวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง แล้วนำมาเปรียบเทียบกับ Mac Farland No. 0.5 (เทียบเท่ากับค่าความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ประมาณ 10⁸ และ 10⁶ CFU/ml ตามลำดับ)

4. เจือจางเชื้อที่เทียบความขุ่นได้แล้ว 1: 100 นำ MHA และ SDA ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส แล้วนำอาหารทุกชนิดดังกล่าวมาเติมแบคทีเรียและยีสต์ที่ปรับความขุ่นแล้ว 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากันแล้วเทลงจานเพาะเชื้อเป็นชั้นที่ 1 (ทำ 2 ซ้ำ)
5. ร่อนอาหารแข็ง จึงใช้ปากคืบ คีบวงแหวนอะลูมิเนียมที่ปราศจากเชื้อวางบนอาหาร ให้มีระยะห่างที่เหมาะสม 4-5 วงแหวนต่อจานอาหาร
6. นำอาหาร MHA และ SDA ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส มาเติมแบคทีเรีย และยีสต์ที่ปรับ ความขุ่นแล้ว 1 มิลลิลิตรตามลำดับ เขย่าให้เข้ากันแล้วเทลงจานเพาะเชื้อเป็นชั้นที่ 2
7. ร่อนอาหารแข็ง จึงใช้ปากคืบ คีบวงแหวนอะลูมิเนียมออกจากอาหาร แผลงในน้ำยาฆ่าเชื้อ จะได้หลุมทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับใส่ตัวอย่างที่จะนำมาทดสอบ
8. หยอดน้ำเลี้ยงเซลล์ทดสอบที่ผ่านการกรองปลอดเชื้อลงไปแต่ละหลุมๆ ละ 100 μ L และหยอดยา Amphotericin B เพื่อเป็นตัวควบคุมชนิดบวก (positive control) สำหรับจานอาหารทดสอบเชื้อยีสต์ และหยอดยาต้านแบคทีเรีย Gentamicin เพื่อเป็นตัวควบคุมชนิดบวกสำหรับจานอาหารทดสอบเชื้อแบคทีเรีย
9. บ่มที่อุณหภูมิ 35 – 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใสที่เกิดขึ้น (รวมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงแหวน)

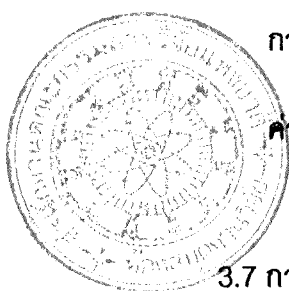
3.6 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลกดิกที่แยกได้ ณ ระยะเวลาต่าง ๆ (Growth curve) การตรวจ growth curve

ศึกษากราฟการเจริญ (growth curve) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS โดยเก็บ

ตัวอย่างเชื้อเพื่อวัดการเจริญ ณ เวลาที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 36, 48 ชั่วโมง โดย

การวัดค่าความขุ่นที่ OD_{600} เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง

ค่าความขุ่นเทียบกับเวลาต่างๆของการเจริญ



3.7 การตรวจคุณสมบัติการย่อยเซลลูโลส (ดัดแปลงจาก Baharuddin et al.2010 และ Teather and Wood, 1982)

ตรวจวัดผลโดยใช้ 1% (w/v) congo red ภาชนะ CMC agar (Merck, Germany) ทิ้งไว้ 15 นาที แล้วล้างด้วย 1 M NaCl ทิ้งไว้อีก 15 นาทีแล้วเทออกเพื่อล้างสีที่เคลือบ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดวิทยาศาสตร์
วันที่..... 15 มิ.ย. 2555
เลขทะเบียน..... 244812
เลขเรียกหนังสือ.....

Congo red แสดงถึงปฏิกิริยาที่ทำกับ องค์ประกอบ Polysacharides β -(1-4) -linked D-Glucopyranosyl unit และมีปฏิกิริยาอย่างมากกับ β -(1-3)-D -glucans และพบได้บ้างใน hemicellulosic galactoglucomannans

วัดผลการย่อยเซลลูโลสโดยตรวจวัดส่วนใสรอบโคโลนี (clear zone)

4. จำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่ได้ หลังจากการตรวจคัดกรองแบคทีเรียในมูลช้างแล้วด้วยวิธีทางชีวเคมี

4.1 ชุดทดสอบการใช้น้ำตาล API ดัดแปลงจาก (ดัดแปลงจาก Sirilun, 2005; Sirilun และคณะ, 2010)

ขั้นตอนเตรียมเชื้อ

แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัยนี้ทำการเพาะแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และทำการเตรียมเชื้อโดยเทียบเชื้อด้วย loop และเลี้ยงในอาหาร MRS และบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อที่ อุณหภูมิ $35-37^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเลือก โคโลนีเดี่ยวย้ายลงใน MRS broth และ บ่มในตู้เลี้ยงเชื้อที่ อุณหภูมิ $35-37^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 10-15 ชั่วโมง ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^9 CFU/ml. หลักการลักษณะการแสดงออกถึงการหมักย่อยน้ำตาลใช้ประเมินโดยใช้ชุดทดสอบ api[®] 50CHL Medium (biomérieux) ตามคำแนะนำที่แนบจากบริษัท ชุด ทดสอบ api[®] 50CHL มีคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด 50 ชนิด ทดสอบคุณสมบัติการย่อยได้ของแบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacillus หากมีการหมักย่อยขึ้นจะปรากฏการเปลี่ยนสี

4.2 ส่งระบุเชื้อ (Phylogenetic Identification) ด้วยวิธี partial 16S RNA sequence ที่ KU-VECTOR CUSTOM DNA SYNTHESIS SERVICE UNIT

5. ประมวลและสรุปข้อมูลผลการทดลองทางห้องปฏิบัติการ

6. รายงาน วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล