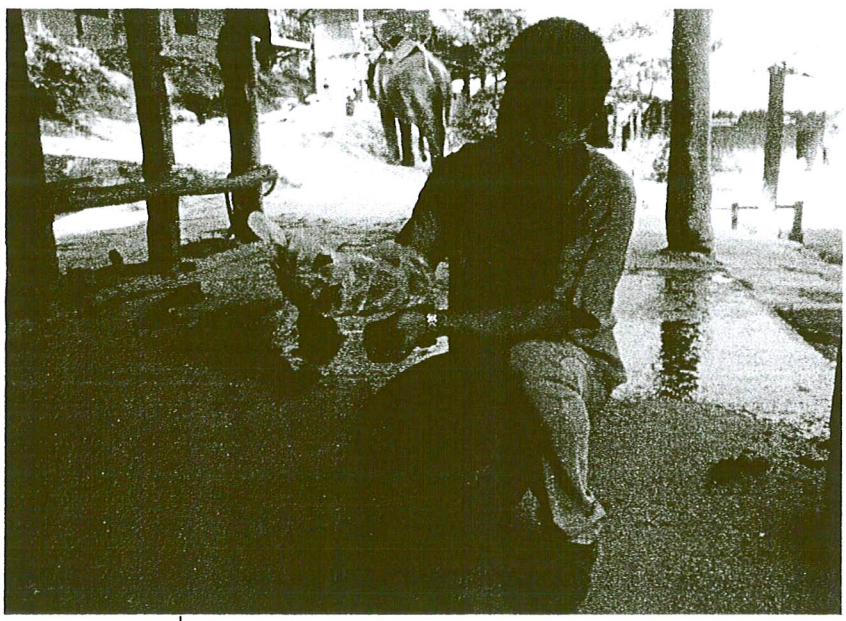
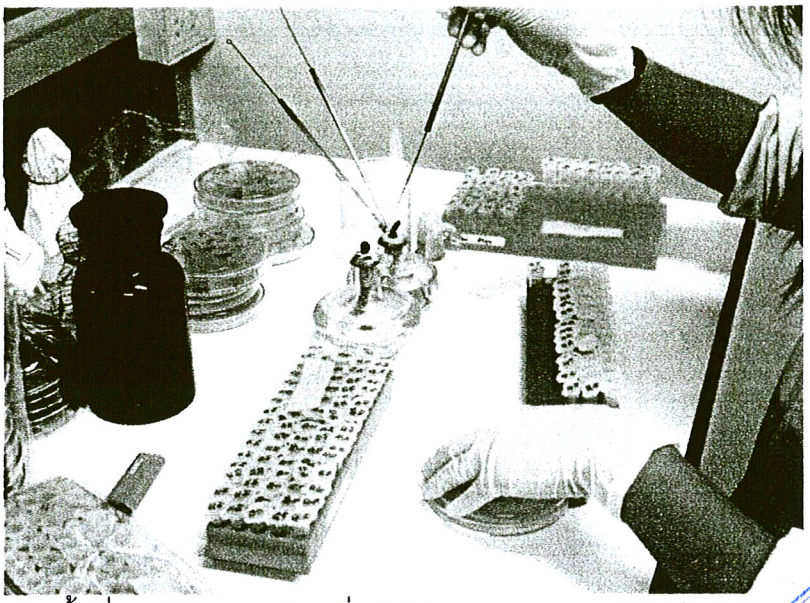
บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. ผลการวิจัย

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างมูลช้าง 27 ตัวอย่างสุขภาพดี ดังรูปที่ 1 ณ ปางช้างแม่สา ในช่วงเดือนมีนาคม- เมษายน 2553 เวลา 8.30-9.30 น. นำมูลช้างส่งเพาะแยกเชื้อภายในเวลา 1-2 ชั่วโมงเพื่อการคัดกรองจุลินทรีย์ทางห้องปฏิบัติการได้ทั้งหมด558 เชื้อ แบ่งตามชนิดของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อและเพื่อคัดแยกจากอาหารสามชนิดได้ดังนี้ จำนวน 147 เชื้อ(Isolate) จากอาหาร PDA,193 เชื้อ (Isolate) จาก อาหารPCA, และ 218 เชื้อ(Isolate) จากอาหาร MRS จากนั้นนำเชื้อที่แยกนำไปตรวจคัดกรองคุณสมบัติ โปรไบโอติก ต่อไปแสดงดัง รูปที่ 2



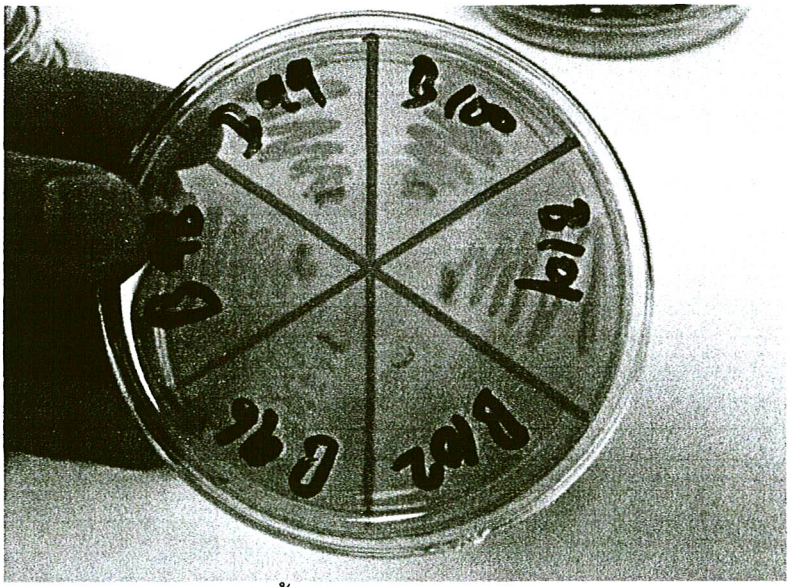
รูปที่ 1 แสดงการเก็บมูลช้าง ที่ขับถ่ายใหม่



รูปที่ 2 แสดงการเก็บเชื้อที่แยกได้จากมูลช้างเพื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

4.1 การคัดกรองและทดสอบคุณสมบัติของโปรไบโอติก



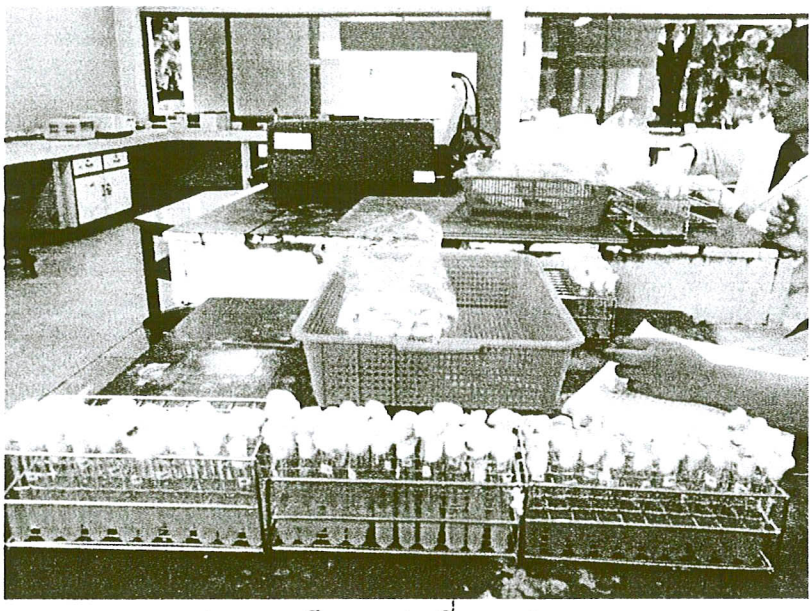
รูปที่ 3 แสดงการทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี

4.1.1 การทนต่อเกลือน้ำดี

Gilliland (1987: อ้างใน รุจา 2544) กล่าวว่า ความสามารถในการรอดชีวิตระหว่างการเดินทางมายังทางเดินอาหารนั้นขึ้นอยู่กับความทนทานต่อเกลือน้ำดี ดังนั้นสมบัติอีกหนึ่งประการของโปรไบโอติกคือต้องสามารถทนต่อเกลือน้ำดีในทางเดินอาหารช้างได้ น้ำดีเป็นสารอันตรายต่อเชื้อจุลินทรีย์เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมีส่วนประกอบของไขมันและกรดไขมัน (Fatty acid)

ทำให้ง่ายต่อการถูกย่อยโดยน้ำดี ดังนั้นความทนทานต่อน้ำดีจึงมีความสำคัญสำหรับการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบติก และความเข้มข้นของน้ำดีเฉลี่ยที่ 0.3 % เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติก (Gilliland และคณะ 1984; อ้างในรุจา, 2544)

จากการทดลองนำเชื้อตัวอย่างจำนวน 330 Isolate พบว่ามีเชื้อตัวอย่างสามารถเจริญได้ทั้งหมด 77 Isolate คิดเป็นร้อยละ 23.33 ดังรูปที่ 3.



รูปที่ 4 แสดงการทดสอบการทนต่อความเป็นกรดด่างที่ pH ต่างๆ

4.1.2 การทนต่อกรด ด่างที่ pH 2-9

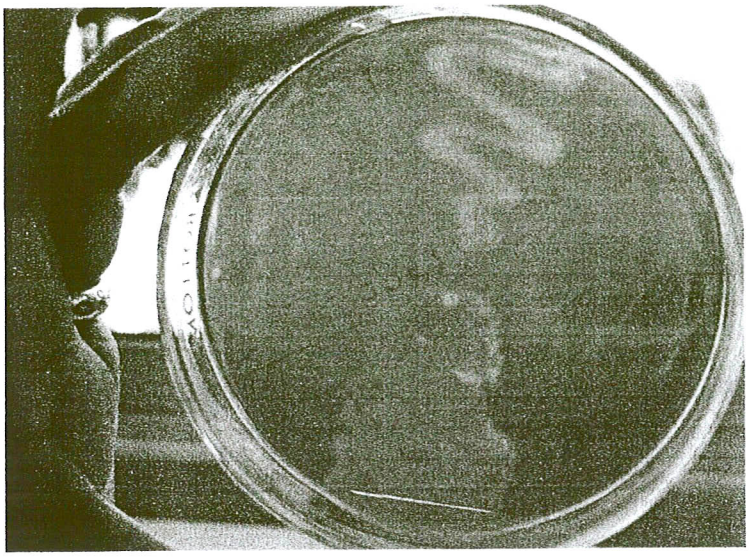
ระบบทางเดินอาหารของช้างยังไม่ทราบความเป็นกรดด่างที่ชัดเจน ในการศึกษานี้จึงเทียบเคียงในส่วนของระบบทางเดินอาหารของม้าซึ่งทราบค่าความเป็นกรดด่างของทางเดินอาหารตั้งแต่หลอดอาหารจนถึงลำไส้เล็กส่วนต้นอยู่ในสภาพเป็นกรด (1.5-2.0) ลำไส้เล็กส่วนปลายเกือบจะเป็นกลาง จะมีช่วงลำไส้ใหญ่ และส่วนไส้ตันที่เป็นตำแหน่งในการหมักย่อยสำคัญสำหรับในม้าจะมีค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่กรดจนถึงด่าง

ดังนั้นควรเลือกแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตในสภาพของความเป็นกรดด่างของระบบทางเดินอาหารเพื่อให้มีชีวิตอยู่รอดและสามารถเจริญเติบโตได้ในลำไส้ส่วนปลายเพื่อให้มีความเหมาะสมต่อการเป็นโปรไบโอติกสำหรับสัตว์ที่การหมักย่อยส่วนท้าย

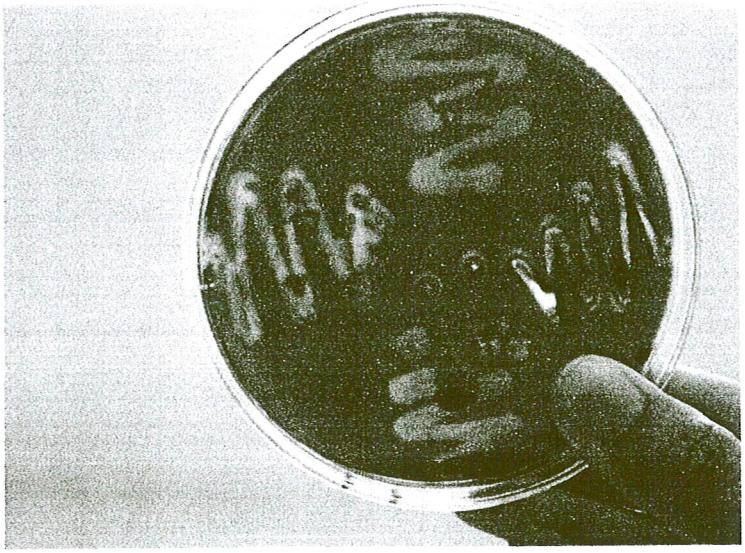
จากผลการทดลองนำเชื้อ 77 ตัวอย่าง สามารถทนต่อน้ำดีมาทดสอบความทนทานต่อความเป็นกรดเบสที่ pH ต่างๆ คือ 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, และ9 ดังรูปที่3. พบว่ามี 30 (ร้อยละ38.96) ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพ pH ที่เป็นกรด 3 และ 4

4.1.3 การทดสอบการย่อยเซลลูโลส (Cellulolytic bacteria)

คุณสมบัติของโปรไบโอติกมีหลายประการสำหรับคุณสมบัติเป้าหมายหลักของการคัดกรองจุลินทรีย์ในการศึกษาครั้งนี้คือ การทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลสได้ ตรวจพบได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลสทั้งหมดเป็นจำนวน 44 Isolate จากตัวอย่างทั้งหมด 275 Isolate คิดเป็นร้อยละ 16



รูปที่ 5 แสดงผลการทดสอบการย่อยเซลลูโลสโดย Congo Red



รูปที่ 6 แสดงการทดสอบการย่อยคาร์โบไฮเดรต

4.1.4 การย่อยแป้ง โปรตีน ไขมัน

จากการนำเอาแบคทีเรีย 30 ตัวอย่างซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผ่านการทดสอบการย่อยเซลลูโลส สามารถทนต่อน้ำดีและทนต่อสภาพกรดและเบส พบว่าเชื้อสามารถย่อยโปรตีน ได้ 4 ตัวอย่าง (ร้อยละ13.33) ดังรูปที่ 7 ย่อยแป้งได้ 2 ตัวอย่าง (ร้อยละ6.66) ดังรูปที่ 6. และย่อยไขมันได้ 8 ตัวอย่าง (ร้อยละ26.66)

รูปที่ 7 แสดงการทดสอบการย่อยโปรตีน

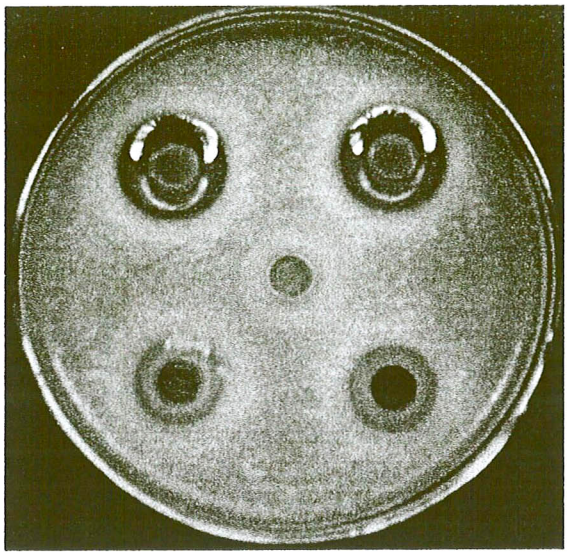
4.1.5 ความสามารถในการเจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

การเจริญเติบโตของเชื้อตัวอย่างในทุกขั้นตอน เป็นการทดสอบการเจริญได้ในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ซึ่งเชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง 5 Isolate ที่คัดเลือกสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนได้ดี

4.1.6 ฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพก่อโรค

จากผลของทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกทั้งหมดแล้ว จึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจำนวน 5 Isolate เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพก่อโรคดังรายละเอียดที่แสดงในตาราง 1.

ตารางที่ 1. แสดงผลของการทดสอบการยับยังเชื้อก่อโรค ของเชื้อ แบคทีเรียตัวอย่าง 5 Isolate (E1-E5) ต่อ 5 เชื้อก่อโรคสำคัญ โดยวิธี agar well diffusion technique



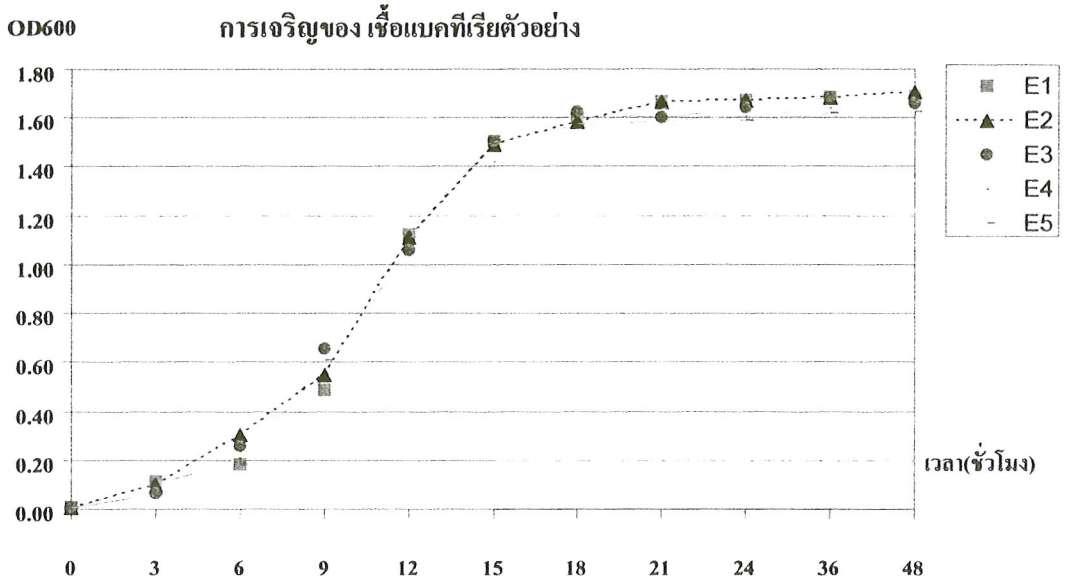
รูปที่ 8 แสดงการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพก่อโรค

ตารางที่ 1. แสดงผลการทดสอบ ฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพก่อโรค 5 เชื้อคือ *E.coli*, *S.aureus*, *B.cerey*, *P.aeruginosa*, *Candida albicans*

ตัวอย่าง	E. coli ATCC	S. aureus ATCC	B. cereus ATCC	P. aeruginosa ATCC	C. albicans ATCC
E1	-	-	-	-	8
E2	-	-	-	-	8
E3	9	8	9	8	12
E4	-	-	-	-	8
E5	8	10	8	8	10

หมายเหตุ : ขนาดโซนวัดรวมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงแหวนด้วยซึ่งเท่ากับ7 มิลลิเมตร

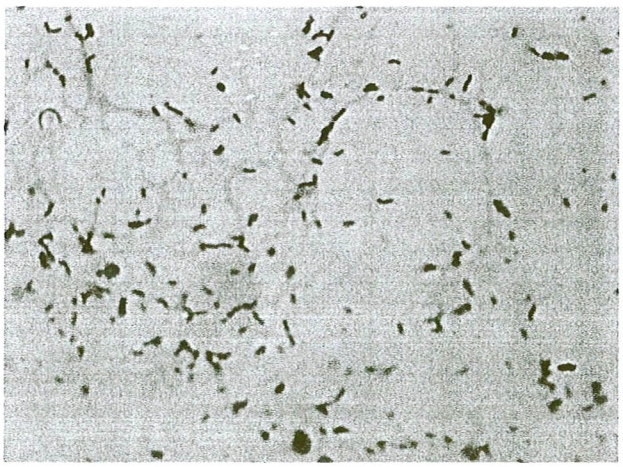
4.1.7 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ ณ ระยะเวลาต่าง ๆ (Growth curve)



รูปที่ 9 แสดงการการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่แยกได้ ณ เวลา 0-48 ชั่วโมง

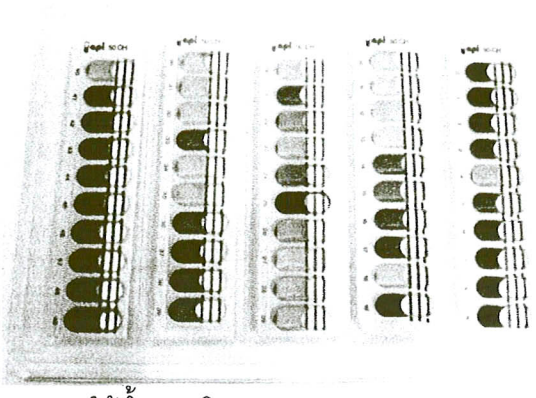
ช่วงปรับตัว (Lag phase) ชั่วโมงที่ 0-6 ของการเจริญ ช่วงที่มีการเจริญแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว (Log phase หรือ Exponential phase) ชั่วโมงที่ 0-18 ของการเจริญเวลาที่ 15-18 ชั่วโมง เชื้อมีการเจริญสูงสุดดังแสดงในรูปที่ 9

4.1.8 การย้อมสีแกรม



รูปที่ 10 แสดงผลการย้อมแกรมติดสีบวก

จากผลการคัดกรองแบคทีเรียจากมูลช้าง สามารถตรวจคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นมาทั้งหมด 5 Isolate ซึ่งเมื่อนำไปทำการย้อมสีแกรมตรวจพบว่าเป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดและติดสีแกรมบวก ดังรูปที่ 10



รูปที่ 11 แสดงผลการทดสอบการใช้น้ำตาลโดยชุดทดสอบ Api® 50 CHL

4.2 ชุดทดสอบการใช้น้ำตาล APi

จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อที่มีคุณสมบัติการทดสอบความเป็นโปรไบโอติก จำนวน 5 เชื้อเพื่อทำการนำไปทดสอบการใช้น้ำตาล จากการทดสอบคุณสมบัติการย่อยน้ำตาล Api ดังรูปที่ 11 จากเชื้อตัวอย่างจำนวน 5 เชื้อ พบความเป็นไปได้ตามความสามารถของการใช้น้ำตาลว่าเป็นชนิดเชื้อ *L. plantalum* หรือ *L. brevis* 2 Isolate, *L. plantalum*, หรือ *L. rhamnosus* จำนวน 2 Isolate และมีความเป็นไปได้ ว่าเป็นเชื้อ *L. brevis* หรือ *L.lactis* 1 Isolate ดังตารางที่2.

ตารางที่2. แสดงลักษณะของการใช้น้ำตาลจากชุดทดสอบ Api ของเชื้อตัวอย่าง E1-E5

ลักษณะการย่อย	E1	E2	E3	E4	E5
Galactose10	+	+	+	+	+
Rhamnose15	-	-	-	-	-
Sorbital19	-	-	-	-	-
N-Acetyl-D-glucosamine22	+	+	+	+	+
Amygdalin23	+	+	+	-	+
Arbutin24	+	+	+	+	+
Esculin25	+	+	+	+	+
Salicin26	+	+	+	+	+
Cellobiose27	+	+	+	+	+
Lactose29	+	+	+	+	+
Melibiose30	-	+	+	+	-
Trehalose32	+	+	+	+	+
Raffinose35	-	-	+	-	-
Gentiobiose39	+	+	+	+	+

4.3 **ส่งระบุเชื้อ** (Phylogenetic Identification)**ด้วยวิธี** partial 16S RNA sequence

เชื้อตัวอย่าง5 **เชื้อคือ** E1- E5 **สามารถระบุเป็นเชื้อในกลุ่ม** *Lactobacillus plantarum* ,*Weissella cibaria* **และ** *Enterococcus sp.* **จากการแสดงออกคือ แกรมบวก,ไม่สร้างสปอร์, ให้ผล** catalase **เป็นลบ และผลการทดสอบการหมักย่อยคาร์โบไฮเดรตและนอกจากนั้นผลการระบุชนิดเชื้อ (** Phylogenetic Identification) **ด้วยวิธีการ** partial 16S rDNA sequence **สามารถระบุความความคล้าย ของ**E1**และ**E2 **เป็นเชื้อชนิดเดียวกันซึ่งใกล้เคียงในระดับ**100 % **กับ เชื้อ** *Weissella cibaria* strain:DH8 **ซึ่งผลชนิดเชื้อรายงานใน** NCBI Genbank **มี** Accession Number **ที่** AB494716 **ส่วน** E3 **และ** E5 **สามารถระบุความความคล้ายใกล้เคียงในระดับ**100 % **กับเชื้อ** *Lactobacillus plantarum strain* LP-01 **ซึ่งผลชนิดเชื้อรายงานใน** NCBI Genbank **มี** Accession Number **ที่** HQ441200 **และ** E4 **สามารถระบุความความคล้ายใกล้เคียงในระดับ**100 % **กับเชื้อ** *Enterococcus sp.* SF-1 **ซึ่งผลชนิดเชื้อรายงานใน** NCBI Genbank **มี** Accession Number **ที่** AB470317