

บทที่ 4

การศึกษาทางจุลินทรีย์วิทยา และทดสอบการใช้ใบและก้านมะขามป้อม ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก

4.1 บทนำ

มะขามป้อมมีสารประกอบสำคัญหลายชนิดที่เป็นประโยชน์ ซึ่งปริมาณของสารเหล่านี้มีมากน้อยต่างกันตามส่วนต่างๆของมะขามป้อม การศึกษาทางเภสัชวิทยาพบว่าสารสกัดจากส่วนต่างๆของมะขามป้อมมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และไวรัส และยังพบว่าสารสกัดหลายชนิดจากส่วนต่างๆของมะขามป้อม สามารถนำมาใช้ควบคุมจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักของโคนมได้ การนำใบและก้านของมะขามป้อมมาใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ในกระเพาะหมัก อาจทำให้จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์เพิ่มจำนวนขึ้น ส่งผลดีต่อประสิทธิภาพการผลิตโคนม จึงมีความสนใจนำใบและก้านของมะขามป้อมมาทดลองศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักของโคนม

4.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลการใช้ใบและก้านมะขามป้อมต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก

4.3 วิธีดำเนินการทดลอง

4.3.1 เตรียมวัตถุดิบ โดยการเก็บเกี่ยวใบ และก้านของมะขามป้อม

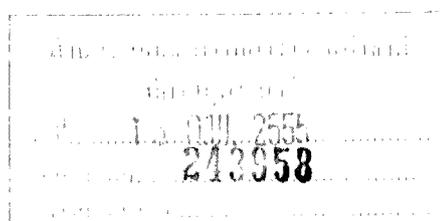
นำใบและก้านมะขามป้อมมาหั่นให้มีชิ้นขนาดเล็ก (ประมาณ 2 นิ้ว) ทำการตากแห้ง (sun dried) และทำการบดผ่านตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร

4.3.2 สัตว์ทดลองและการจัดการ

ใช้โคลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชียนเจาะกระเพาะ จำนวน 6 ตัว น้ำหนักตัวเฉลี่ย 457 ± 4 กิโลกรัม แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มการทดลอง กลุ่มการทดลองละ 3 ตัว คือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริมใบและก้านมะขามป้อม โคทุกตัวจะถูกเลี้ยงในคอก โดยแยกคอกละ 1 ตัว

4.3.3 อาหารและการให้อาหาร

โคเจาะกระเพาะแต่ละตัวจะถูกเลี้ยงในคอกขังเดี่ยวและมีระยะเวลาการปรับตัวให้คุ้นเคยกับอาหารใหม่เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยโคทุกตัวจะได้รับอาหารชั้นที่มีเปอร์เซ็นต์โปรตีน 16% ตัวละ 3 กิโลกรัมต่อวัน แบ่งให้เป็น 2 มื้อเท่าๆ กัน (07.00 น. และ 16.00 น.) และได้รับฟางข้าวและน้ำสะอาดอย่างเต็มที่ สำหรับโคในกลุ่มทดลองนั้นจะได้รับใบและก้านมะขามป้อมบดวันละ 0.64 กิโลกรัมต่อตัว แบ่งให้เป็น 2 มื้อเท่าๆ กัน



4.3.4 การเก็บตัวอย่างและการศึกษาทางจุลินทรีย์วิทยา

4.3.4.1 จุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก

หลังจากที่โคเจาะกระเพาะได้ปรับตัวให้คุ้นเคยกับอาหารตามกลุ่มทดลองแล้วเป็นระยะเวลา 7 วัน (ระยะปรับตัว) ให้โคเจาะกระเพาะได้รับอาหารตามกลุ่มทดลองต่อไปอีกเป็นระยะเวลา 10 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างอาหารที่กำลังหมักย่อยในกระเพาะหมัก ในวันที่ 11 ของระยะทดลอง และเก็บตัวอย่างในเวลา 3 ชั่วโมงหลังการให้อาหารมือเช้า สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารในกระเพาะหมักจากตำแหน่งต่างๆ ประมาณ 75 กรัม ต่อตัว บรรจุลงถุงพลาสติก รััดด้วยยางให้มิดชิด นำถุงตัวอย่างใส่ในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งบรรจุอยู่ รีบนำไปยังห้องปฏิบัติการทันที

4.3.4.1 โพรโตซัวในกระเพาะหมัก

ทำการเก็บตัวอย่าง ในวันที่และเวลาเดียวกันกับการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาจำนวนจุลินทรีย์อื่นๆ แต่เป็นการเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมักจากตำแหน่งต่างๆ ในกระเพาะหมัก ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำบรรจุลงในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มี normal saline และ formaldehyde solution (10% v/v) ใน 0.85% (w/v) sodium chloride ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการแบ่งตัวของโปรโตซัว แล้วนำไปยังห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจนับเซลล์โปรโตซัวต่อไป

4.3.5 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์และการตรวจนับ

4.3.5.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

ดำเนินการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ 4 ชนิด คือ Potato dextrose agar (PDA), Mitis salivarius agar (MSA), Shahidi Ferguson Perfringens agar (SFP agar) และ de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar) โดยชั่งผงอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตรที่บรรจุน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ต้มกำลังเดือด คนเป็นระยะ เพื่อให้ผงอาหารเพาะเลี้ยงละลาย เมื่อละลายดีแล้ว นำไปบรรจุในขวดแก้วทนความร้อน แล้วนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดัน ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ยกเว้น MRS agar ที่ไม่ต้องนำไปนึ่ง) หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้อุ่น (ไม่ควรทิ้งไว้จนเย็นเกินไป เพราะจะทำให้อาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แข็งตัว) นำไปเทใน Petri dish ชนิดอาหารเพาะเลี้ยงละ 12 อัน รวมทั้งสิ้น 48 อัน

4.3.5.2 การเตรียมอาหารจากกระเพาะหมัก (rumen digesta)

ชั่ง rumen digesta น้ำหนัก 50 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 25 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปิเปิดของเหลวในขวดรูปชมพู่ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตรที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้ของเหลวในหลอดทดลองรวม 10 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกันนี้เพื่อเจือจางของเหลวในหลอดทดลอง จนได้ความเข้มข้น 10^{-3} เท่า

4.3.5.3 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์และการตรวจนับ

ปิเปตของเหลวที่ได้จาก rumen digesta ที่ผ่านการเจือจางจนได้ความเข้มข้น 10^{-3} เท่า ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ใส่ลงใน petri dish ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ เปลี่ยนให้ทั่ว petri dish บรรจุ petri dish ลงในถุงพลาสติก ใส่แผ่น anaeropack 1 แผ่น ลงในถุงพลาสติก เพื่ออุดออกซิเจนภายในถุง ทำให้ภายในถุงพลาสติกมีสภาพไร้ออกซิเจน นำไปบ่มในตู้ปรับอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำมาตรวจนับโคโลนีจุลินทรีย์ บนที่กผล

4.3.6 การเตรียมตัวอย่างและการตรวจนับโปรโตซัว

นำของเหลวจากกระเพาะหมักที่ผสมอยู่กับสารละลาย มาตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยวิธีการ hematocrip คือ หยดของเหลวลงบนเครื่อง Hemacytomcter จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 40 เท่า ตรวจนับและบันทึกผล

4.3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลจำนวนประชากรจุลินทรีย์ที่บันทึกได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี t-test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS (SAS, 1996)

4.4 ผลการทดลอง

ผลการทดลองเสริมใบและก้านมะขามป้อมบดให้กับโคนมเจาะกระเพาะต่อชนิดและประชากรจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักแสดงไว้ในตารางที่ 4.1 ใบและก้านมะขามป้อมบดไม่มีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ ทั้ง *Lactobacilli sp.*, *Clostridium sp.*, *Streptococcus sp.*, *Aspergillus sp.* และโปรโตซัว อย่างไรก็ตาม มีแนวโน้ม ($p = 0.0828$) ทำให้ประชากรโปรโตซัว ลดลง (7.58 vs 6.84×10^5 /1 g digesta)

Table 4.1 Effect of ground amla leaves/branches on rumen micro-organisms ($\times 10^5$ cfu/g digesta) and protozoa ($\times 10^5$ /g digesta)

Type of micro-organism	Control	Amla	SEM	%CV	p - value
<i>Lactobacilli sp.</i>	1.97	5.32	3.14	105.9	0.6683
<i>Clostridium sp.</i>	13.60	16.00	5.28	43.4	0.3508
<i>Streptococcus sp.</i>	3.20	2.15	1.53	70.0	0.5253
<i>Aspergillus sp.</i>	3.87	9.49	4.31	79.1	0.2625
Protozoa ($\times 10^5$ /g digesta)	7.58	6.84	0.24	18.9	0.0828

4.5 วิจารณ์ผลการทดลอง

ใบและก้านมะขามป้อมบดมีแนวโน้มทำให้ประชากรโปรโตซัวในกระเพาะหมักลดลง ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจาก ใบและก้านมะขามป้อมมีสารประกอบจำพวก flavonoids ที่อาจมีฤทธิ์ในการยับยั้ง โปรโตซัว งานวิจัยส่วนใหญ่จะศึกษาผลของการใช้ชิ้นส่วนของพืช เช่น ใบ หัว สารสกัดจากพืช และ น้ำมันหอมระเหยจากพืช ต่อประชากรจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ ในขณะที่การศึกษาในตัวสัตว์นั้น แทบไม่มีเลย ประชากรจุลินทรีย์ อาทิ *Lactobacilli sp.*, *Clostridium sp.*, *Streptococcus sp.* และ *Aspergillus sp.* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในงานวิจัยครั้งนี้ ในขณะที่จำนวนประชากร โปรโตซัวมีแนวโน้มลดลง ในทางตรงกันข้าม Cordozo et al. (2006) รายงานว่าส่วนผสมของ cinnamaldehyde (0.18 g/d) และ eugenol (0.09 g/d) มีผลทำให้ประชากรของ holotrichs เพิ่มขึ้นอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่ anise oil มีผลทำให้จำนวนประชากรของโปรโตซัวลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ Patra et al. (2006) ศึกษาผลการใช้สารสกัดจากพืช 5 ชนิด (*Acacia concinna*, *Terminalia chebula*, *Terminalia bellerica*, *Emblica officinalis* (amla) and *Azadirachta indica* ในสารละลายที่แตกต่างกัน; ethanol, methanol และน้ำ) ต่อประชากรโปรโตซัว และพบว่า *Emblica officinalis* (amla) ไม่มีผลต่อประชากรโปรโตซัว ผลการทดลองที่มีรายงาน ค่อนข้างผันแปร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช สารสกัดจากพืช หรือน้ำมันหอมระเหยจากพืช ดังนั้น ยังคงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาวิจัยอีกมาก ก่อนที่จะสรุปผลการศึกษาวิจัยที่แน่ชัด นอกจากนี้ควรทำการศึกษาวิจัยในตัวสัตว์อีกด้วยโดยเฉพาะในโครีดนม เพื่อที่จะได้ผลสรุปของการ ศึกษาวิจัยที่สามารถนำไปปฏิบัติได้

4.6 สรุปผลการทดลอง

ใบและก้านมะขามป้อมบดไม่มีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์อื่นๆ แต่มี แนวโน้ม ($p = 0.0828$) ทำให้ประชากรโปรโตซัว ลดลง (7.58 vs 6.84×10^5 /g digesta)