บทที่ 4
วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองแยกเชื้อ *Streptococcus* spp. สายพันธุ์ต่างๆจากน้ำนมดิบซึ่งได้รับจากฟาร์ม 4 แห่ง โดยใช้อาหารที่จำเพาะต่อเชื้อ *Streptococcus* spp. ได้แก่ อาหารแข็ง Azide Dextrose (Difco.,1984) และ อาหารแข็ง M 17 (Skinner และ Quesnel., 1978) โดยในอาหารแข็ง Azide Dextrose เป็นอาหารที่ใช้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียพวกที่ ไม่มีไซโตโครม (Cytochrome) เท่านั้น ซึ่งเราจะทำการเก็บโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง Azide Dextrose มาเพาะเลี้ยงจนได้โคโลนีเดี่ยวที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นจะนำเชื้อที่ได้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง M 17 เพื่อเก็บรักษาและทำการทดลองต่อไป จากการทดลองพบว่าจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหาร Azide Dextrose Agar ทั้งหมดสามารถแยกได้ 76 โคโลนี จากนั้นจึงนำมาคัดเลือกเชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดโรคโดยดูจากผลการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ซึ่งสามารถคัดเลือกเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ทั้งหมด 38 สายพันธุ์ โดยเราจะนำเชื้อ *Streptococcus* spp. แต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้มาทดสอบลักษณะทางชีวเคมี และสัณฐานวิทยาตามหลักของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ปรากฏว่าเชื้อ *St.* spp. ที่แยกได้ทั้งหมด 38 สายพันธุ์ สามารถจำแนกได้เป็น *St. uberis* 15 สายพันธุ์ , *St. sorbrinus* 13 สายพันธุ์ , *St. lactis* (*Lactococcus lactis*) 6 สายพันธุ์ และ *St. agalactiae* 4 สายพันธุ์ ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้สามารถตรวจพบได้ในน้ำนมดิบ ผิวหนัง ริมฝีปาก และบริเวณเต้านมของวัว (Deibel และ Seeley., 1974 ; Jeremy., 1986)

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบของ *Streptococcus* spp. ที่แยกได้ โดยการนำส่วนน้ำใส (supernatant) ของเชื้อ *Streptococcus* spp. อายุ 36 ชั่วโมง ที่มีค่าความเป็นกรด - ด่าง ประมาณ 5.0 - 5.5 และส่วนน้ำใสที่มีการปรับค่าความเป็นกรด - ด่าง ให้มีค่า 6.5 เพื่อตัดผลของการยับยั้งการเจริญที่เกิดจากกรดอินทรีย์ที่เชื้อสร้างขึ้น (Dominico และคณะ., 1989) จากนั้นนำมาทดสอบกับเชื้อทดสอบ 7 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* , *Escherichia coli* , *Listeria monocytogenes* , *Pseudomonas aeruginosa* , *Salmonella typhi* , *Salmonella typhimurium* และ *Staphylococcus aureus* โดยวิธีการดูดซึมของสารผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Agar Diffusion) พบว่าเมื่อทดสอบโดยวิธี Agar Diffusion จะเกิดบริเวณใส (Clear Zone) กับเชื้อทดสอบเพียงชนิดเดียว คือ *S. aureus* แต่เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของส่วนน้ำใสที่มีการปรับค่าความเป็นกรด - ด่าง ให้มีค่าเท่ากับ 6.5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Tube Test)

โดยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอยของเชื้อทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จะพบว่าส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *S. spp.* ที่มีการปรับค่าความเป็นกรด - ด่างให้มีค่า 6.5 สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบได้ทั้ง 7 ชนิด

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยวิธีการดูดซึมบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งกับวิธีการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว พบว่าสามารถตรวจพบการการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดีในวิธีการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เนื่องจากวิธี Agar Diffusion จะมีข้อจำกัดอย่างมากในการทดสอบ (Alfred และ Davision., 1990) เช่น ความสามารถในการแพร่ของสารต่อต้านจุลชีพผ่านเนื้อวุ้น ซึ่งเกี่ยวข้องกับเปอร์เซนต์วุ้น ปริมาณความชื้นในเนื้อวุ้น น้ำหนักโมเลกุลของสารต่อต้านจุลชีพเอง หรืออาจเกิดจากความไม่เที่ยงในการเทวุ้น ส่วนวิธีการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจะตรวจดูผลการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบโดยตรวจวัดเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าของเชื้อทดสอบเปรียบเทียบกับเชื้อทดสอบที่มีการเติมสารต่อต้านจุลชีพ ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้สามารถเห็นผลได้ชัดเจนกว่าวิธี Agar Diffusion ดังนั้นจึงเลือกวิธีการตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยการทดสอบในอาหารเหลวในการทดลองขั้นต่างๆ ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการทดลองของ อาภัสรา , 2537 และจากผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยใช้ส่วนน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ *St.* spp. สายพันธุ์ที่แยกได้ ทั้งที่ปรับและไม่ปรับค่าความเป็นกรด - ด่าง ให้มีค่าเท่ากับ 6.5 โดยการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารแข็ง พบว่า ค่าความเป็นกรด - ด่างของส่วนน้ำใสมีผลต่อการยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยอาจจะมีผลเพิ่มหรือลดประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ ดังผลการทดลองในตารางที่ 6 - 7 ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Brenen และ Davidson., 1990 ที่กล่าวว่าสารต่อต้านจุลชีพแต่ละชนิดมีช่วงของค่าความเป็นกรด - ด่างที่เหมาะสมในการทำงานต่างกัน

จากผลการทดสอบความสามารถในการเคิร์ดน้ำนม และผลการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยวิธี Agar Diffusion สามารถคัดเลือก *St.* spp. ที่เคร์ดน้ำนมได้รวดเร็วและยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (*S. aureus*) โดยให้บริเวณยับยั้งกว้างได้ 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ TD 1 , สายพันธุ์ TD 3 และ สายพันธุ์ NO 2 ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 2 และตารางที่ 6 ซึ่งเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์นี้สามารถจัดจำแนกได้เป็นเชื้อ *Streptococcus uberis* (TD 1 และ TD 3) และ *Streptococcus sobrinus* (NO 2) และเมื่อทำการทดลองต่อเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่สร้างสารต่อต้านจุลชีพได้ดีที่สุด พบว่าเชื้อ *St.* spp. สายพันธุ์ TD 1 และ TD 3 ให้ผลในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดีกว่าสายพันธุ์ NO 2 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2 - 10 และตารางที่ 8

นอกจากนี้ยังอาจตรวจพบการแตกของเซลล์ *E. coli* ที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อ *St.* sp. สายพันธุ์ TD 3 สังเกตได้จากรูปที่ 5 ที่ค่าการดูดกลืนแสงลดต่ำลง เนื่องจากเชื้อ *St.* spp. สายพันธุ์ TD 1 และ TD 3 ให้ผลการหน่วงเหนี่ยวเชื้อทดสอบได้ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญของเชื้อ *St.* spp. สายพันธุ์ TD 1 และ สายพันธุ์ TD 3 เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกต่อไป ผลการเปรียบเทียบระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญพบว่า เชื้อ *St.* sp. สายพันธุ์ TD 1 ใช้ระยะเวลาในการเจริญน้อยกว่าสายพันธุ์ TD 3 เล็กน้อย คือเชื้อ *St.* sp. สายพันธุ์ TD 1 จะใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า เท่ากับ 3.18 ชั่วโมง ในขณะที่เชื้อ *St.* sp. สายพันธุ์ TD 3 ใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า เท่ากับ 3.3 ชั่วโมง ดังผลการทดลองในรูปที่ 11

ในการสกัดแยกสารต่อต้านจุลชีพออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1 กระทำโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว 0 - 60 % , 60 - 70 % และ 70 - 80 % พบว่าสารต่อต้านจุลชีพที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 70 - 80 % มีฤทธิ์ในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Piard และคณะ , 1992 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 12 - 18 และตารางที่ 9 จากนั้นนำสารต่อต้านจุลชีพที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 - 80 % ไปทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส และทำการชะคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่าโปรตีนที่ผ่านจากคอลัมน์ทั้ง 2 ช่วง (ช่วงแรก ได้แก่ ลำดับส่วนที่ 9 - 12 และ ช่วงหลัง ได้แก่ ลำดับส่วนที่ 62 - 64) สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อได้ใกล้เคียงกัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 20 - 26 และตารางที่ 10 โดยโปรตีนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วยความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 325 - 400 มิลลิโมลาร์ (ลำดับส่วนที่ 62 - 64) จะหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดีกว่าโปรตีนที่ออกจากคอลัมน์ในลำดับส่วนที่ 9 - 12 เล็กน้อย จากผลการทดลองนี้แสดงว่าสารต่อต้านจุลชีพมีประจุเป็นบวกที่ไม่แรงมากเนื่องจากสามารถถูกชะออกจากคอลัมน์ได้ในช่วงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ไม่สูงมาก ดังผลการทดลองในรูปที่ 19 ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการทดลองของ Davey และ Richardson , 1981

เมื่อรวมสารละลายที่ได้จากคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส ที่มีผลในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดี คือ ในลำดับส่วนที่ 62 - 64 แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยอาศัยหลักการแยกสารตามขนาดน้ำหนักโมเลกุลในคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี 50 ซึ่งคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี 50 สามารถแยกสารได้ดีในช่วงน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,500 - 30,000 ดาลตัน (Phamacia Fine Chemicals., 1983) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าส่วนที่ถูกชะที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ไม่สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อได้ และตรวจไม่พบโปรตีนในส่วนที่ถูกชะที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์นี้ ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้

ทำการทดลองซ้ำหลายครั้งแต่ก็ได้ผลการทดลองเช่นเดิม ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองใหม่ โดยนำสารต่อต้านจุลชีพที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 70 - 80 % และยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี 50 โดยคาดว่าจะพบโปรตีนในส่วนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ และสามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบได้ ผลการทดลองปรากฏว่า ตรวจไม่พบโปรตีนในส่วนที่ถูกชะผ่านคอลัมน์นี้และไม่พบความสามารถในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบในส่วนที่ถูกชะเช่นเดิม ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้ คาดว่าเกิดจากการทำปฏิกริยาของส่วนที่กลัวน้ำ (hydrophobic) ของสารต้านจุลชีพกับ เม็ดเจล (gel matrix) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Piard และคณะ , 1992

เมื่อนำสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆ มาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสบนโซเดียม โดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจล โดยใช้เซพาเรตติงเจลที่มีความเข้มข้น 20 % และ สแตกกิงเจลที่มีความเข้มข้น 5.0 % ผลการทดลองพบว่าสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส ในลำดับส่วนที่ 9 - 12 เท่านั้นที่พบแถบของโปรตีน และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,100 ดาลตัน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Piard และคณะ , 1992 แต่ไม่พบแถบของโปรตีนในสารต่อต้านจุลชีพที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 70 - 80 % และในส่วนของสารต่อต้านจุลชีพที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส ในลำดับส่วนที่ 62 - 64 และหลังจากนำมาย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส และอะไมเลส พบว่าแถบโปรตีนที่ได้จากสารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส ในลำดับส่วนที่ 9 - 12 ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ไลเปส และถูกย่อยได้บางส่วนด้วยเอนไซม์โปรติเอส จากผลที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส และการทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี 50 และ การศึกษาสมบัติบางประการโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจล จึงคาดว่าสารต่อต้านจุลชีพที่แยกได้จากเชื้อ *St.* sp. สายพันธุ์ TD 1 น่าจะเป็นสารประเภทไลโพโปรตีน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,100 ดาลตัน

ผลที่ได้จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารต่อต้านจุลชีพโดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส บนโซเดียมโดเดซัลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลพบว่าสารต่อต้านจุลชีพที่สร้างจาก *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1 มีขนาดเล็กมาก คือมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,100 ดาลตัน เท่านั้น ซึ่งอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไม่สามารถทำสารต่อต้านจุลชีพนี้ให้บริสุทธิ์ได้โดยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี 50 เนื่องจากคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี 50 จะสามารถแยกสารได้ดีในช่วงน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1,500 - 30,000 ดาลตัน และจากหลักการแยกสารโดยอาศัยน้ำหนักโมเลกุลที่ว่าสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล

มากจะสามารถถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เร็ว ส่วนสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยที่สามารถผ่านเข้าไปในรูของเม็ดเจลได้ จะใช้เวลาในการถูกชะนานกว่า ซึ่งสารต่อต้านจุลชีพที่สร้างโดย เชื้อ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1 มีขนาดเล็กมากจึงอาจจะติดอยู่ในคอลัมน์และไม่สามารถถูกชะออกมาได้

จากผลการทดลองนี้สารต่อต้านจุลชีพที่แยกได้จากเชื้อ *Streptococcus* sp. สายพันธุ์ TD 1 อาจนำไปประยุกต์ใช้ในการเตรียมสารถนอมอาหารในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป เพราะสามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคโดยมีกำเนิดจากอาหาร และเชื้อที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ แต่ควรที่จะศึกษาถึงภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของสารต่อต้านจุลชีพ เช่น ค่าความเป็นกรด - ด่าง อุณหภูมิ และควรทำการทดสอบหาประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบในอาหารที่ต้องการจะใช้สารต่อต้านจุลชีพนี้ในการถนอมอาหารด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย