

การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจากอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดี โดยวิธีไม้ป้ายลำคอ*

Isolation of Lactic Acid Bacteria from Healthy Thai Volunteers Using Throat Swab Test

ดร.เจียร ธีระวรวงศ์**

บทคัดย่อ

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกเป็นเชื้อที่นิยมนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกที่สำคัญในคน การจะได้เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกเพื่อนำไปใช้ในด้านต่างๆ จำเป็นต้องแยกเชื้อให้ได้ก่อนเป็นขั้นตอนแรก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและเก็บรวบรวมแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์ไทยจากอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดีโดยวิธีไม้ป้ายลำคอ โดยทำการเก็บเชื้อจากอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดีทั้งในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาและบริเวณชุมชนที่ติดกับมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา เมื่อได้เชื้อที่แยกได้แล้ว นำเชื้อไปศึกษาถึงลักษณะโคโลนีของเชื้อ การทดสอบแกรม และค่า pH ของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

ผลการศึกษาพบว่าอาสาสมัครทั้งหมดสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ อาสาสมัครคนไทยในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา อาสาสมัครคนไทยในบริเวณชุมชนไทยพุทธรอบมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จ

เจ้าพระยา และอาสาสมัครคนไทยในบริเวณชุมชนไทยอิสลามรอบมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา โดยมีจำนวนอาสาสมัครรวมทั้ง 3 กลุ่ม เป็นจำนวน 232 คน สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 188 เชื้อ ลักษณะโคโลนี แบ่งได้เป็น 3 แบบ คือ ขนาดเล็ก สีขาวขุ่น ขอบเรียบ หนูน ขนาดกลาง สีขาวขุ่น ขอบเรียบ หนูน และขนาดใหญ่ สีขาวขุ่น ขอบเรียบ หนูน เชื้อมีการทดสอบแกรมบวกทั้งหมดและมีค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวในช่วงระหว่าง 3.6-6.2 การวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อระหว่างกลุ่มของอาสาสมัครพบว่าจำนวนเชื้อที่แยกได้จากอาสาสมัครในแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสรุปวิธีไม้ป้ายลำคอสามารถนำมาใช้ในการคัดแยก และเก็บรวบรวมแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์ไทยจากอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดีได้

คำสำคัญ: การคัดแยก / แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก / คอ / คนไทย

*ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ประจำปีงบประมาณ 2558

** อาจารย์ ประธานสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) are commonly used as probiotic in human. It is necessary to isolate the LAB in the first step before using the bacteria in various aspects. The objective of this study was to isolate and collect LAB from healthy Thai volunteers by using throat swab test. The isolation of LAB from healthy Thai volunteers was done in the area of Bansomdejchaopraya Rajabhat University and the community surrounding Bansomdejchaopraya Rajabhat University. The isolated LAB were determined for colony morphology, Gram staining, and pH value in the cultured medium.

The results showed that the volunteers could be classified into 3 groups, Thai volunteers in the area of Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Thai volunteers in the area of Thai Buddhist community surrounding Bansomdejchaopraya Rajabhat University, and Thai volunteers in the

area of Thai Islamic community surrounding Bansomdejchaopraya Rajabhat University. The total number of volunteers in 3 groups was 232. The total number of isolated LAB was 188. The colony morphology of these isolates could be classified into 3 types which were small, medium, and large size with the color of opaque-white and smooth convex edge. All LAB were Gram positive. The study of pH value in the cultured medium demonstrated that pH ranging from 3.6–6.2. The analysis of variance of numbers of isolated LAB between volunteer groups showed no statistical significance between groups. In conclusion, throat swab test could use for isolation and collection of LAB Thai strains from healthy Thai volunteers.

Keywords: Isolation / Lactic acid bacteria / Throat / Thai

ความสำคัญของปัญหาการวิจัย

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (Lactic acid bacteria: LAB) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ เป็นเชื้อประจำถิ่นในคน สามารถพบได้หลายแห่งในร่างกายโดยทั่วไปอาศัยอยู่ในปาก ลำคอ และลำไส้ มีความปลอดภัย (Generally recognized as safe: GRAS) จึงเป็นเชื้อที่นิยมนำมาคัดเลือกสายพันธุ์เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติก (Probiotic) โพรไบโอติกเป็นเชื้อที่ให้ประโยชน์ต่อร่างกาย นิยามของโพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งเมื่อให้ในปริมาณที่เหมาะสมจะเสริมสร้างสุขภาพที่ดีต่อโฮสต์ (FAO/WHO, 2001)

ตัวอย่างของการนำแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกไปใช้ประโยชน์ เช่น ในกรณีของผู้ที่มีภาวะคอเลสเตอรอลสูงในเส้นเลือด (Hypercholesterol) จะทำให้เกิดความเสี่ยงสำหรับโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตในหลายประเทศ ไม่ว่าจะเป็นในประเทศที่พัฒนาแล้ว ประเทศทาง

โลกตะวันตก หลายประเทศในทวีปยุโรป (Kumar et al., 2012; Lim et al., 2004; Oner et al., 2014) รวมถึงในประเทศไทย (Khonputsra et al., 2010) การลดระดับคอเลสเตอรอลในซีรัมเป็นปัจจัยสำคัญในการป้องกันความเสี่ยงจากโรคหัวใจและหลอดเลือด (Lim et al., 2004) ยากลุ่ม Statin มีประสิทธิภาพในการลดระดับคอเลสเตอรอลสามารถนำมาใช้ในการรักษาผู้ที่มีภาวะคอเลสเตอรอลสูงได้ อย่างไรก็ตาม ยาเหล่านี้มีราคาแพงและยังมีผลข้างเคียงที่รุนแรง (Ahire et al., 2012; Kumar et al., 2012) จึงจำเป็นที่จะต้องหาวิธีการรักษาทางเลือกที่มีประสิทธิภาพในการลดระดับคอเลสเตอรอล มีราคาถูก และมีผลข้างเคียงน้อย มีรายงานที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกสามารถลดระดับคอเลสเตอรอลได้ (Kumar et al., 2012) มีการศึกษาพบว่า เมื่อนำแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกไปใส่เป็นส่วนเสริมในนม พบว่ามีศักยภาพในการลดระดับคอเลสเตอรอลได้เช่นเดียวกัน (Chandan, 1999; de Roos and Katan, 2000) และยังมีรายงานถึง

ประสิทธิภาพที่ดีของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกในการลดระดับคอเลสเตอรอลจากการศึกษาในคน หนู และหมู (Haberer et al., 2003; Kawase et al., 2000; Sadrzadeh-Yeganeh et al., 2010)

เมื่อไม่นานมานี้ มีรายงานที่เสนอแนะว่าการแยกโพรไบโอติกจากประชากรนั้นๆ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ เนื่องจาก Microbiome ที่อยู่ในลำไส้มีความแตกต่างกันระหว่างประชากรแต่ละกลุ่ม การใช้โพรไบโอติกจากประชากรต่างกลุ่มจึงมีประสิทธิภาพไม่เท่าเทียมกัน (Barzegari and Saei, 2012) ดังนั้น ในกรณีของคนไทยจึงมีความจำเป็นที่จะต้องแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์ไทย เพื่อนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับการลดระดับคอเลสเตอรอลในคนไทยที่มีภาวะคอเลสเตอรอลสูง

การจะได้แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกเพื่อนำไปใช้ในด้านต่างๆ ขั้นตอนแรกจำเป็นที่จะต้องแยกเชื้อจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี หลังจากนั้นจึงนำไปทดสอบถึงคุณสมบัติที่สนใจได้ มีรายงานการแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจากอุจจาระของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี (Ha et al., 2006; Lim et al., 2004) อย่างไรก็ตาม วิธีการแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจากอุจจาระจะต้องอาศัยวิธีการที่ยุ่งยาก ต้องมีอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับขนย้าย (Transport media) และภาชนะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บตัวอย่างก่อนส่งห้องปฏิบัติการ ระหว่างการเก็บตัวอย่างอุจจาระจะต้องอาศัยความระมัดระวังของอาสาสมัครในการเก็บไม่ให้อุจจาระสัมผัสกับวัตถุอื่นนอกเหนือจากภาชนะที่ใช้ในการเก็บ มิฉะนั้นอาจปนเปื้อนเชื้ออื่นๆ ที่ไม่ต้องการซึ่งจะทำให้เกิดความลำบากในการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก ตัวอย่างอุจจาระจะต้องมีปริมาณที่เหมาะสมไม่น้อยเกินไป อีกทั้งอุจจาระนั้นยังมีกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ รวมถึงไม่สามารถควบคุมลักษณะของอุจจาระให้คงที่ อาจมีลักษณะเหลวหรือแข็งขึ้นกับอาหารที่อาสาสมัครบริโภค ดังนั้น การเก็บตัวอย่างอุจจาระอาจทำให้อาสาสมัครรู้สึกรังเกียจและสกปรก จึงไม่ให้ความร่วมมือในการเก็บที่ดีพอ (Fischbach and Dunning III, 2015)

นอกจากนี้แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกยังสามารถแยกได้จากชั้นเนื้อจากกระเพาะอาหาร (Hakalehto et al., 2011) และชั้นเนื้อจากลำไส้ (Kontula et al., 2000) อย่างไรก็ตาม การแยกเชื้อด้วยวิธีนี้ต้องอาศัยเครื่องมือ

เฉพาะที่อยู่ในโรงพยาบาลและต้องอาศัยแพทย์ที่มีความเชี่ยวชาญ โดยการส่องกล้องเพื่อตรวจกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก ก่อนส่องกล้องผู้ถูกตรวจจะได้รับยาชา การส่องกล้องนี้สามารถตัดชิ้นเนื้อเพื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ต่อไปได้ แต่ก่อนจะเข้ารับการตรวจผู้ถูกตรวจจะต้องมีการเตรียมร่างกายให้พร้อมก่อนตรวจ เช่น พักผ่อนให้เพียงพอ รับประทานอาหารก่อนตรวจ เป็นต้น ผู้ถูกตรวจบางรายอาจรู้สึกเครียดและวิตกกังวลวิธีการนี้จึงไม่เหมาะที่จะทำการเก็บเชื้อในปริมาณมาก เพราะต้องอาศัยเครื่องมือเฉพาะบุคลากรทางการแพทย์ และมีค่าใช้จ่ายสูง (Fischbach and Dunning III, 2015)

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกสามารถพบได้ตลอดทางเดินอาหารของคน แต่ละส่วนของทางเดินอาหารจะพบในปริมาณมากน้อยแตกต่างกัน ในช่องปากและคอมีความหลากหลายของสายพันธุ์ของเชื้อ อีกทั้งยังสามารถพบได้ในปริมาณมาก (10^8 – 10^9 cells/mL) (Zhang and Cai, 2014) บริเวณนี้จึงมีความเหมาะสมที่จะทำการแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกการแยกเชื้อด้วยวิธีไม่ป้ายลำคอ (throat swab test) (Fischbach and Dunning III, 2015) มีข้อดี คือ เป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่ซับซ้อนมีราคาแพง ไม่ทำให้เกิดการบาดเจ็บต่ออาสาสมัครรวมถึงมีความเหมาะสมในการแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกในบริเวณลำคอ ซึ่งจะทำให้ได้เชื้อในปริมาณมาก

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

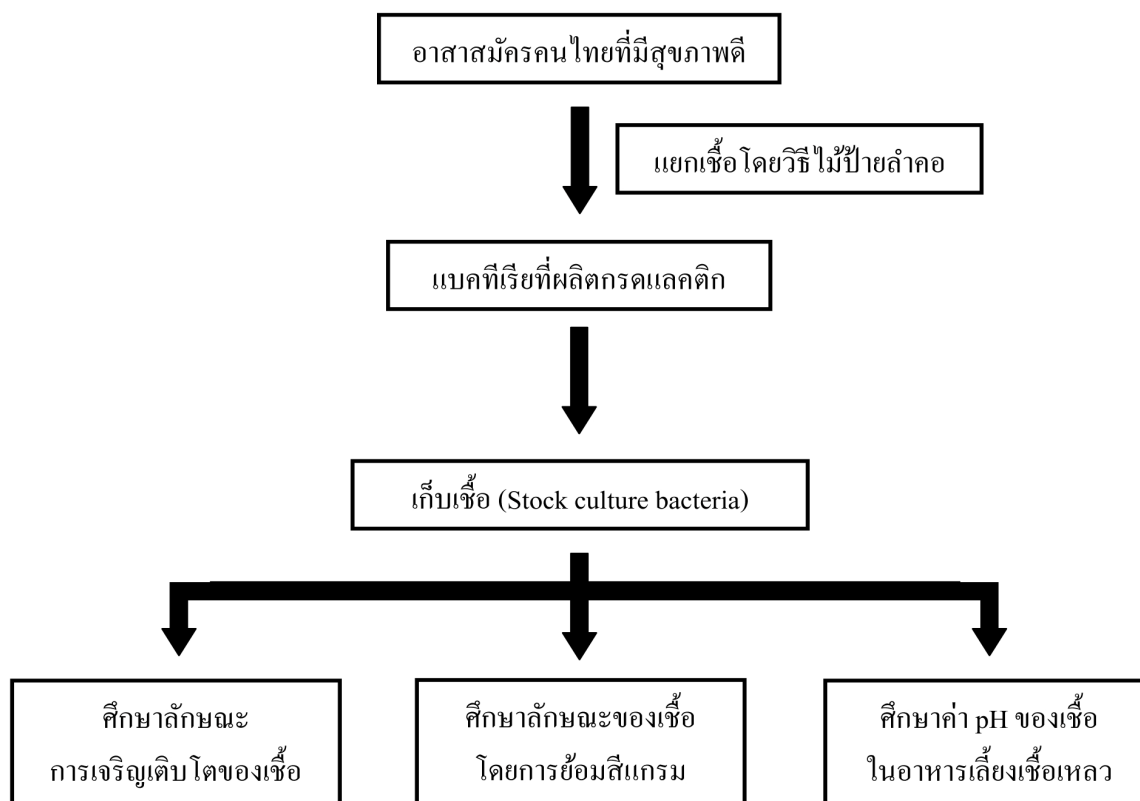
เพื่อคัดแยกและเก็บรวบรวมแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์ไทยจากอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดี โดยวิธีไม่ป้ายลำคอในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา และบริเวณชุมชนที่ติดกับมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

กรอบแนวความคิดการวิจัย

จากแนวคิด การทบทวนวรรณกรรม และวัตถุประสงค์ของการวิจัยที่ได้กล่าวมาแล้ว ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาเป็นกรอบแนวความคิดการวิจัย โดยออกแบบการศึกษาทดลองเริ่มจากการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกโดยวิธีไม่ป้ายลำคอในอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดีทั้งในบริเวณ

มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาและบริเวณชุมชนที่ติดกับมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา จากนั้นทำการเก็บเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด แล้วนำไปทำการ

ศึกษาในด้านลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ ลักษณะของเชื้อโดยการย้อมสีแกรม และค่า pH ของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 กรอบแนวความคิดการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย

อาสาสมัครการพิทักษ์สิทธิ์ผู้เข้าร่วมการวิจัยและการแยกเชื้อ

งานวิจัยนี้ได้ดำเนินการภายใต้การกำกับดูแลและติดตามจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาอาสาสมัครเป็นคนไทยที่มีสุขภาพดีอยู่ในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาและบริเวณชุมชนที่ติดกับมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นสองชุมชนคือ ชุมชนไทยพุทธและชุมชนไทยอิสลามการศึกษาในอาสาสมัครเหล่านี้เพื่อให้สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้จำนวนมากและเปรียบเทียบในด้านลักษณะของเชื้อว่ามีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มของอาสาสมัครหรือไม่เนื่องจากการดำเนินชีวิตในแต่ละกลุ่มของอาสาสมัคร อาสาสมัครทุกคนกรอกแบบประวัติข้อมูลอาสาสมัครซึ่งประกอบด้วย

ข้อมูลทั่วไป คือ ชื่อ-นามสกุล เพศ ศาสนา เชื้อชาติ สัญชาติ อาชีพ วัน-เดือน-ปีเกิด อายุ ระดับการศึกษา ที่อยู่ เบอร์โทรศัพท์ และอีเมล ก่อนที่อาสาสมัครลงนามในเอกสารยินยอมเข้าร่วมการวิจัย อาสาสมัครได้รับการอธิบายจากผู้วิจัยถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย ระยะเวลาของการทำวิจัย วิธีการวิจัย อันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัยการพิทักษ์สิทธิ์ผู้เข้าร่วมการวิจัย รวมทั้งประโยชน์ที่จะเกิดขึ้นจากการวิจัย มีเวลาและโอกาสเพียงพอในการซักถามข้อสงสัยจนมีความเข้าใจเป็นอย่างดี

ข้อมูลของอาสาสมัครถูกเก็บเป็นความลับและไม่มีการเปิดเผยตัวตน โดยผ่านกระบวนการเก็บข้อมูล การบันทึกข้อมูลในคอมพิวเตอร์ การวิเคราะห์ และการรายงานข้อมูลเพื่อวัตถุประสงค์ทางวิชาการเท่านั้น อาสาสมัครถูกสัมภาษณ์เพื่อประเมินถึงสุขภาพเบื้องต้น โดยมีสาระสำคัญคือ ประวัติสุขภาพ/การป่วย อาการป่วยล่าสุด ปัญหาสุขภาพ

การดื่มแอลกอฮอล์ และการออกกำลังกาย ขณะการสัมภาษณ์ ถ้าพบว่าอาสาสมัครเป็นโรคร้ายแรงหรือมีปัญหาสุขภาพ จะไม่ได้รับคัดเลือกเพื่อเข้าร่วมในการวิจัย รวมถึงถ้าอาสาสมัครมีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อรักษาการติดเชื้อจะไม่ถูกคัดเลือกเช่นเดียวกัน เนื่องจากผลของยาปฏิชีวนะสามารถรบกวนสมดุลของเชื้อประจำถิ่นได้ ผู้วิจัยไม่ได้เสนอผลประโยชน์ใดๆ ให้แก่อาสาสมัคร

อาสาสมัครที่ผ่านการคัดเลือกจะถูกไม่พันสำลีป้ายคอเพื่อแยกเชื้อต่อไป การแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจากอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดีโดยวิธีการใช้ไม้ป้ายลำคอ มีขั้นตอนคือ ให้อาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดีอ้าปาก ใช้ไม้พันสำลีป้ายบริเวณคอของอาสาสมัคร นำไม้พันสำลีนั่นไปแช่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar และนำอาหาร MRS agar ที่ผ่านการเชี่ยเชื้อมาแล้วไปดำเนินการต่อในห้องปฏิบัติการ

การเลี้ยงเชื้อ

เชื้อที่ได้จากการป้ายคอถูกนำมาเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar โดยทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อที่เจริญขึ้นบนอาหารถูกนำไปแยกให้เป็นเชื้อเดี่ยว

การแยกเชื้อให้เป็นเชื้อเดี่ยว

เชื้อที่เจริญขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดของ

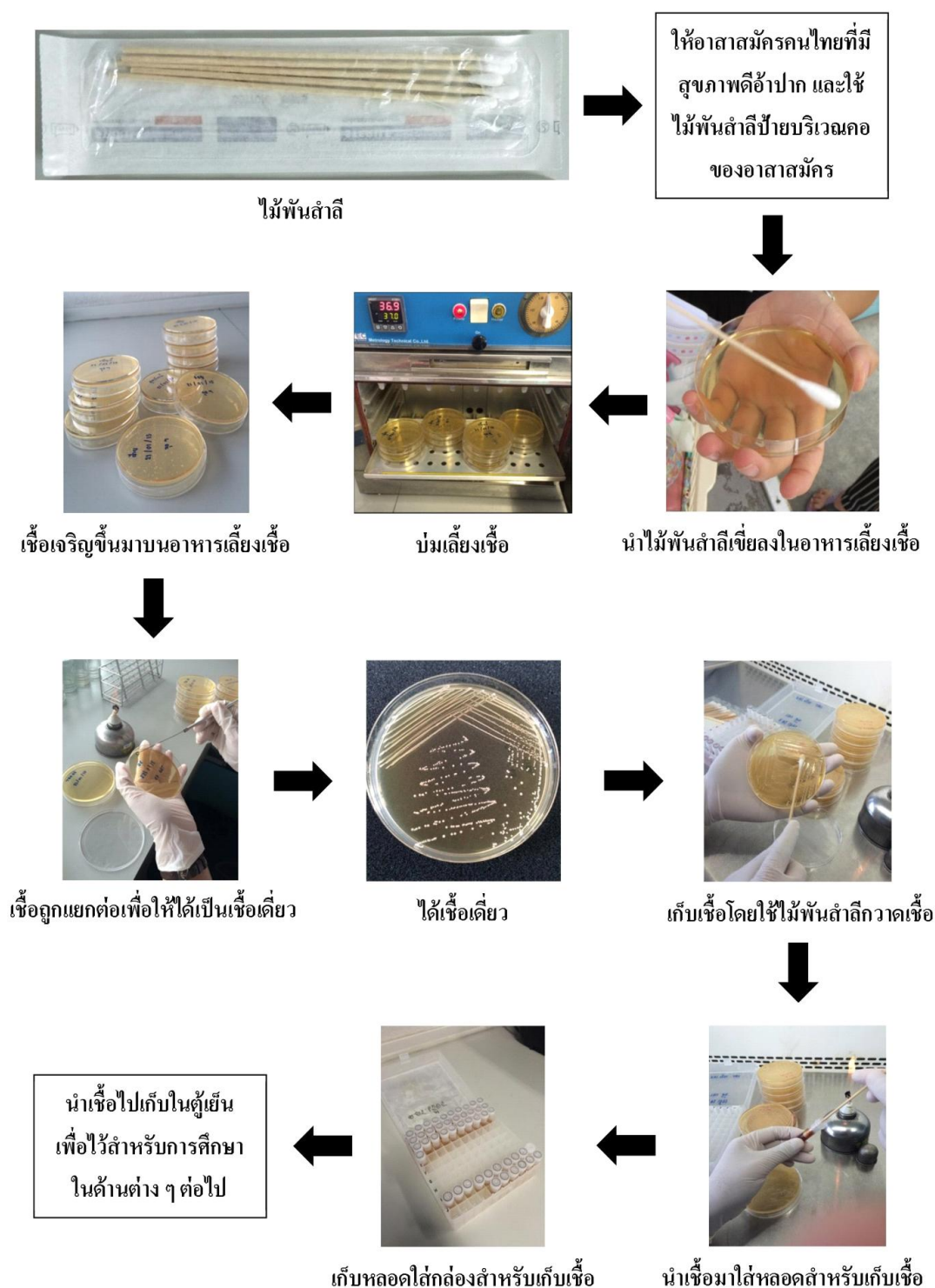
เชื้อ/โคโลนี (isolate) ถูกแยกเพื่อนำไปเลี้ยงให้เป็นเชื้อเดี่ยว (single isolate) มีขั้นตอนคือ นำโคโลนีนั้นๆ มาทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารอีกครั้งหนึ่ง (subculture) บนอาหาร MRS agar ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เชื้อที่ขึ้นมากควรเป็นเชื้อเดี่ยว ถ้ายังไม่ได้เป็นเชื้อเดี่ยวจะทำการ subculture ต่อไปจนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์ที่ไม่ปะปนกับเชื้อชนิดอื่น เมื่อได้เชื้อเดี่ยวแล้วทำการเก็บเชื้อ

การเก็บเชื้อ

ทำการเก็บรวบรวมเชื้อในอาหารสำหรับเก็บเชื้อคือ MRS broth ที่มีการเติม 20% glycerol โดยมีขั้นตอนคือ ทำการเก็บเชื้อที่เป็นเชื้อเดี่ยวโดยใช้ไม้พันสำลิกวาดเชื้อที่เจริญขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ให้หมด นำเชื้อมาใส่หลอดสำหรับเก็บเชื้อที่มีอาหารสำหรับเก็บเชื้ออยู่ นำเชื้อไปเก็บไว้ที่ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส เพื่อไว้สำหรับการศึกษาด้านต่างๆ ต่อไปแผนภาพแสดงขั้นตอนต่างๆ ในการแยกเชื้อจากอาสาสมัครจนถึงการเก็บเชื้อ สามารถสรุปได้ ดังรูปที่ 2

การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ

นำเชื้อเดี่ยวที่ได้มาทำการศึกษาลักษณะของเชื้อ โดยทำการสังเกตลักษณะของโคโลนีในด้านต่างๆ คือ ขนาด (เล็ก/กลาง/ใหญ่) ขอบ (หยัก/เรียบ) สี



รูปที่ 2 แผนภาพแสดงขั้นตอนต่างๆ ในการแยกเชื้อจากอาสาสมัครจนถึงการเก็บเชื้อ

การศึกษาลักษณะของเชื้อโดยการย้อมสีแกรม
 ศึกษาการติดสีแกรม (Gram staining) ของเชื้อเดี่ยวที่ได้โดยใช้วิธีการย้อมสีแกรมมาตรฐาน เพื่อตรวจวิเคราะห์ว่าเชื้อที่แยกได้เป็นเชื้อชนิดแกรมบวกหรือแกรมลบ
 ดังขั้นตอนต่อไปนี้ ใช้ลูป (Loop) เขี่ยเชื้อเดี่ยวที่ขึ้นบน MRS agar มา 1 โคโลนี เกลี่ยเชื้อ (Smear) บนสไลด์

ให้กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ โดยไม่ให้เชื้อเกาะเป็นกระจุกหนาแน่นมากเกินไป แล้วปล่อยให้แห้งในอากาศ (Air dry) ตรึงเชื้อ (Fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์ ซึ่งจะทำให้เชื้อไม่หลุดออกจากแผ่นสไลด์ขณะย้อมสี การตรึงเชื้อทำได้โดยการนำสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อทิ้งไว้จนแห้งแล้วไปผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง ซึ่งมีข้อควรระวัง คือ

ห้ามลงไฟนานเกินไปเพราะอาจทำให้เซลล์แบคทีเรียเปลี่ยนรูปร่างได้ หยดสี crystal violet ลงในสไลด์บริเวณที่เกลี่ยเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสีทิ้ง หยดสารละลาย Lugol's iodine ลงในสไลด์บริเวณที่เกลี่ยเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสารละลายทิ้ง สารละลาย Lugol's iodine จะทำหน้าที่ช่วยให้เซลล์แบคทีเรียติดสี ย้อมได้ดีขึ้น ล้างสีออกด้วย 95% ethyl alcohol โดยหยดลงในสไลด์บริเวณที่เกลี่ยเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 15 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น หยดสี Safranin ลงในสไลด์บริเวณที่เกลี่ยเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น แล้วซับให้แห้ง จากนั้นนำสไลด์ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าเชื้อที่ทำการย้อมเป็นเชื้อแกรมบวก จะย้อมติดสีม่วงของ Crystal violet แต่ถ้าเชื้อที่ทำการย้อมเป็นเชื้อแกรมลบจะย้อมติดสีแดงของ Safranin

การศึกษาค่าความเป็นกรด-เบสของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

นำเชื้อเดี่ยวที่ได้มาทำการศึกษาค่าความเป็นกรดเบส (pH) ของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว มีขั้นตอนคือใช้ลูปเขี่ยเชื้อเดี่ยวที่ขึ้นบน MRS agar มา 1 โคโลนีใส่เชื้อลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาณ 10 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ pH meter เนื่องจากเมื่อเชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจะมีการปลดปล่อยกรดออกมา เพราะเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก ดังนั้นค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนไป

การวิเคราะห์สถิติ

จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกที่แยกได้ในแต่ละกลุ่มของอาสาสมัครถูกนำมาวิเคราะห์หาค่าความถี่ ผลรวม ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อระหว่างกลุ่มด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$

ผลการวิจัย

ข้อมูลทั่วไปของอาสาสมัคร

ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก

และการเก็บตัวอย่างของอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดี โดยใช้วิธีไม่ป้ายลาคอ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดีได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คืออาสาสมัครคนไทยในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา อาสาสมัครคนไทยในบริเวณชุมชนไทยพุทธรอบมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา และอาสาสมัครคนไทยในบริเวณชุมชนไทยอิสลามรอบมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ผลการเก็บข้อมูลของอาสาสมัครในกลุ่มต่างๆ (ตารางที่ 1) มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ผลการเก็บตัวอย่างของอาสาสมัครคนไทยในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาพบว่า มีอาสาสมัครทั้งหมด 91 คน อาสาสมัครเพศหญิงมีจำนวนมากกว่าเพศชาย (เพศหญิง 56 คน คิดเป็น 61.54% และเพศชาย 35 คน คิดเป็น 38.46% ตามลำดับ) โดยเป็นนักศึกษาในระดับปริญญาตรีทั้งหมด (91 คน คิดเป็น 100%) ในช่วงอายุระหว่าง 18-24 ปี ซึ่งอาสาสมัครอายุ 21 ปี มีจำนวนมากที่สุด (30 คน คิดเป็น 32.96%)

ผลการเก็บตัวอย่างของอาสาสมัครคนไทยในบริเวณชุมชนไทยพุทธรอบมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาพบว่า มีอาสาสมัครทั้งหมด 74 คน อาสาสมัครเพศหญิงมีจำนวนมากกว่าเพศชาย (เพศหญิง 51 คน คิดเป็น 68.92% และเพศชาย 23 คน คิดเป็น 31.02% ตามลำดับ) โดยมีระดับการศึกษาในระดับต่ำกว่าปริญญาตรีมากที่สุด (57 คน คิดเป็น 77.03%) ประกอบอาชีพแม่บ้านมากที่สุด (21 คน คิดเป็น 28.38%) ในช่วงอายุระหว่าง 15-84 ปี ซึ่งอาสาสมัครอายุ 59 ปี มีจำนวนมากที่สุด (5 คน คิดเป็น 6.76%) และไม่ระบุอายุจำนวน 1 คน (1.35%)

ผลการเก็บตัวอย่างของอาสาสมัครคนไทยในบริเวณชุมชนไทยอิสลามรอบมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาพบว่า มีอาสาสมัครทั้งหมด 67 คน อาสาสมัครเพศหญิงมีจำนวนมากกว่าเพศชาย (เพศหญิง 34 คน คิดเป็น 50.75% และเพศชาย 33 คน คิดเป็น 49.25% ตามลำดับ) โดยมีระดับการศึกษาในระดับต่ำกว่าปริญญาตรี มากที่สุด (52 คน คิดเป็น 77.61%) ประกอบอาชีพแม่บ้านมากที่สุด (19 คน คิดเป็น 28.36%) ในช่วงอายุระหว่าง 13-75 ปี ซึ่งอาสาสมัครอายุ 17 ปี และ 62 ปี มีจำนวนมากที่สุด (4 คน คิดเป็น 5.97% และ 4 คน คิดเป็น 5.97% ตามลำดับ)

ตารางที่ 1 สรุปผลการศึกษาในด้านข้อมูลทั่วไป ลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม และค่าความเป็นกรด-เบสในแต่ละกลุ่มของอาสาสมัคร

ตัวแปร	คนไทยใน บริเวณ มบส.	ชุมชนไทยพุทธ รอบ มบส.	ชุมชนไทยอิสลาม รอบ มบส.	หมายเหตุ
เพศ	หญิง >ชาย (61.54% > 38.46%)	หญิง >ชาย (68.92% > 31.02%)	หญิง >ชาย (50.75% > 49.25%)	
ระดับการศึกษา	ปริญญาตรี (100%)	ต่ำกว่าปริญญาตรี (77.03%)	ต่ำกว่าปริญญาตรี (77.61%)	ระดับ การศึกษาที่ พบมากที่สุด
อาชีพ	นักศึกษา (100%)	แม่บ้าน (28.38%)	แม่บ้าน (28.36%)	อาชีพที่พบ มากที่สุด
ช่วงอายุ	18-24 ปี	15-84 ปี	13-75 ปี	
จำนวนเชื้อที่แยก ได้จากอาสาสมัคร ทั้งหมด	69 เชื้อ จาก 91 คน	56 เชื้อ จาก 74 คน	63 เชื้อ จาก 67 คน	
รหัส	TBA	TBU	TIS	
ลักษณะโคโลนี	ขนาดเล็ก สีขาวขุ่น	ขนาดเล็ก สีขาวขุ่น	ขนาดเล็ก สีขาวขุ่น	
	ขอบเรียบ นูน	ขอบเรียบ นูน	ขอบเรียบ นูน	
	ขนาดกลาง สีขาวขุ่น	ขนาดกลาง สีขาวขุ่น	ขนาดกลาง สีขาวขุ่น	
	ขอบเรียบ นูน	ขอบเรียบ นูน	ขอบเรียบ นูน	
	ขนาดใหญ่ สีขาวขุ่น	ขนาดใหญ่ สีขาวขุ่น	ขนาดใหญ่ สีขาวขุ่น	
	ขอบเรียบ นูน	ขอบเรียบ นูน	ขอบเรียบ นูน	
การติดสีแกรม	+	+	+	
ช่วง pH	4.1-6.2	4.1-6.2	3.6-5.9	

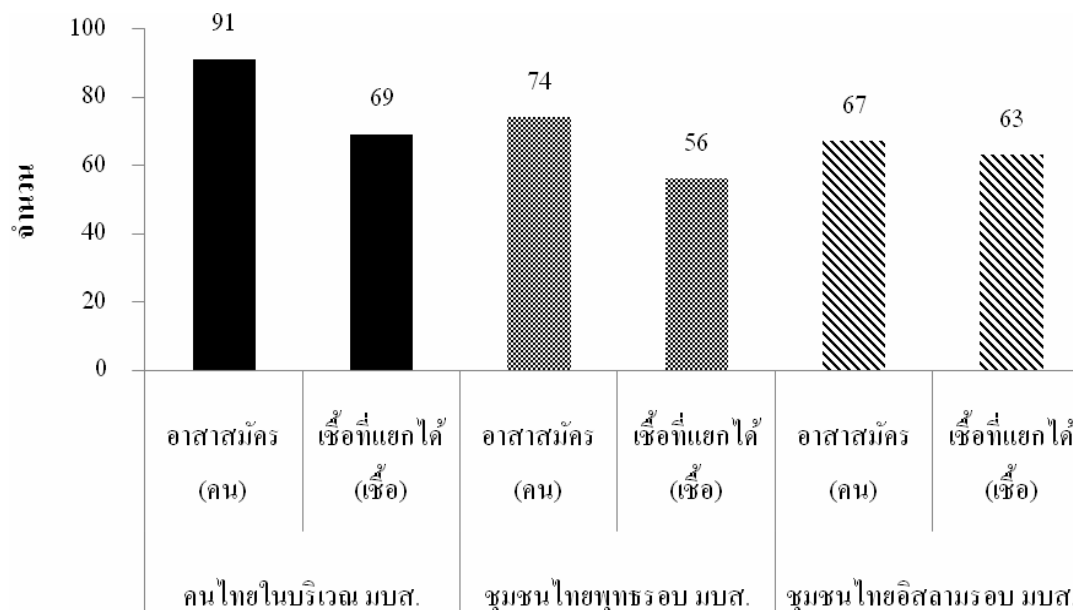
คนไทยในบริเวณ มบส. หมายถึง อาสาสมัครคนไทยในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
ชุมชนไทยพุทธรอบ มบส. หมายถึง อาสาสมัครคนไทยในบริเวณชุมชนไทยพุทธรอบมหาวิทยาลัยราชภัฏ
บ้านสมเด็จเจ้าพระยา

ชุมชนไทยอิสลามรอบ มบส. หมายถึง อาสาสมัครคนไทยในบริเวณชุมชนไทยอิสลามรอบมหาวิทยาลัยราชภัฏ
บ้านสมเด็จเจ้าพระยา

ผลการแยกเชื้อ ลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม และค่าความเป็นกรด-เบส

ผลการแยกเชื้อในอาสาสมัครกลุ่มต่างๆ สามารถเขียนกราฟแสดงจำนวนเปรียบเทียบได้ ดังแสดงใน

รูปที่ 3 เมื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้แล้วนำไปศึกษาต่อในด้านลักษณะของโคโลนี การติดสีแกรม และค่าความเป็นกรด-เบสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวได้ผลดังต่อไปนี้



รูปที่ 3 เปรียบเทียบจำนวนของเชื้อที่แยกได้ในแต่ละกลุ่มของอาสาสมัคร ตัวเลขที่อยู่เหนือกราฟแสดงถึงจำนวนของอาสาสมัครและเชื้อที่แยกได้

คนไทยในบริเวณ มบส. หมายถึง อาสาสมัครคนไทยในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
ชุมชนไทยพุทธรอบ มบส. หมายถึง อาสาสมัครคนไทยในบริเวณชุมชนไทยพุทธรอบมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

ชุมชนไทยอิสลามรอบ มบส. หมายถึง อาสาสมัครคนไทยในบริเวณชุมชนไทยอิสลามรอบมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

ผลการเก็บตัวอย่างของอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดีในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา จำนวน 91 คน สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้ทั้งหมด 69 เชื้อ เมื่อนำเชื้อที่แยกได้มาศึกษาในด้านต่างๆ พบว่า เชื้อมีลักษณะโคโลนีแบ่งได้สามแบบ คือ ขนาดเล็ก สีขาวขุ่น ขอบเรียบ หนูน ขนาดกลาง สีขาวขุ่น ขอบเรียบ หนูน และ ขนาดใหญ่ สีขาวขุ่น ขอบเรียบ หนูน โดยติดสีแกรมบวกทั้งหมด มีค่า pH เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวอยู่ในช่วงระหว่าง 4.1-6.2 (ตารางที่ 1)

ผลการเก็บตัวอย่างของอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดีในบริเวณชุมชนไทยพุทธรอบมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา จำนวน 74 คน สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้ทั้งหมด 56 เชื้อ เมื่อนำเชื้อที่แยกได้มาศึกษาในด้านต่างๆ พบว่า เชื้อมีลักษณะโคโลนีแบ่งได้สามแบบ คือ ขนาดเล็ก สีขาวขุ่น ขอบเรียบ หนูน ขนาดกลาง สีขาวขุ่น ขอบเรียบ หนูน และ ขนาดใหญ่

สีขาวขุ่น ขอบเรียบ หนูน โดยติดสีแกรมบวกทั้งหมด มีค่า pH เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวอยู่ในช่วงระหว่าง 4.1-6.2 (ตารางที่ 1)

ผลการเก็บตัวอย่างของอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดีในบริเวณชุมชนไทยอิสลามรอบมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา จำนวน 67 คน สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้ทั้งหมด 63 เชื้อ เมื่อนำเชื้อที่แยกได้มาศึกษาในด้านต่างๆ พบว่า เชื้อมีลักษณะโคโลนีแบ่งได้สามแบบ คือ ขนาดเล็ก สีขาวขุ่น ขอบเรียบ หนูน ขนาดกลาง สีขาวขุ่น ขอบเรียบ หนูน และ ขนาดใหญ่ สีขาวขุ่น ขอบเรียบ หนูน โดยติดสีแกรมบวกทั้งหมด มีค่า pH เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวอยู่ในช่วงระหว่าง 3.6-5.9 (ตารางที่ 1)

อาสาสมัครทั้ง 3 กลุ่ม รวมเป็นจำนวน 232 คน สามารถแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้ทั้งหมด 188 เชื้อ ซึ่งพบว่ามีลักษณะโคโลนีในแบบต่างๆ อยู่ 3 แบบ

คล้ายกันในทุกกลุ่มของอาสาสมัคร คือ ขนาดเล็ก สีขาว ชุ่ม ขอบเรียบ หนูน (รูปที่ 4) ขนาดกลาง สีขาวชุ่ม ขอบเรียบ หนูน (รูปที่ 5) และ ขนาดใหญ่ สีขาวชุ่ม ขอบเรียบ หนูน (รูปที่ 6) ติดสีแกรมบวกทั้งหมด มีค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอยู่ในช่วงระหว่าง 3.6-6.2 จากผลการศึกษาสามารถอนุมานได้ว่าอาจเนื่องมาจากอาสาสมัครเหล่านี้ยัง

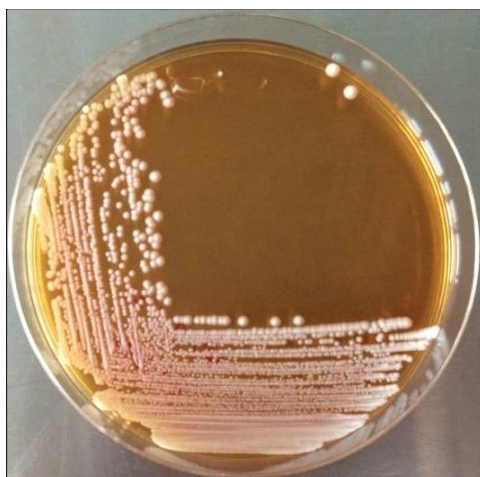
ในบริเวณใกล้เคียงกันจึงมีลักษณะของเชื้อประจำถิ่นไม่แตกต่างกัน ซึ่งสะท้อนถึงการมีปัจจัยและสภาพแวดล้อมใกล้เคียงกันผลการวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อระหว่างกลุ่มของอาสาสมัครพบว่า จำนวนเชื้อที่แยกได้จากอาสาสมัครในแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.318$) ดังแสดงในตารางที่ 2



รูปที่ 4 แสดงลักษณะโคโลนีขนาดเล็ก สีขาวชุ่ม ขอบเรียบ หนูน (เชื้อรหัส TBA1)



รูปที่ 5 แสดงลักษณะโคโลนีขนาดกลาง สีขาวชุ่ม ขอบเรียบ หนูน (เชื้อรหัส TBA13)



รูปที่ 6 แสดงลักษณะโคโลนีขนาดใหญ่ สีขาวขุ่น ขอบเรียบ หนูน (เชื้อรหัส TBA65)

ตารางที่ 2 ค่าสถิติพื้นฐาน และการวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อระหว่างกลุ่ม

	N	Mean	S.D.
คนไทยในบริเวณ มบส.	91	0.76	0.779
ชุมชนไทยพุทธรอบ มบส.	74	0.76	0.888
ชุมชนไทยอิสลามรอบ มบส.	67	0.94	0.833
รวม	232	0.81	0.831

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ความแปรปรวนระหว่างกลุ่ม	1.591	2	0.796	1.153	0.318
ความแปรปรวนภายในกลุ่ม	158.064	229	0.690		
รวม	159.655	231			

คนไทยในบริเวณ มบส. หมายถึง อาสาสมัครคนไทยในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
 ชุมชนไทยพุทธรอบ มบส. หมายถึง อาสาสมัครคนไทยในบริเวณชุมชนไทยพุทธรอบมหาวิทยาลัยราชภัฏ
 บ้านสมเด็จเจ้าพระยา

ชุมชนไทยอิสลามรอบ มบส. หมายถึง อาสาสมัครคนไทยในบริเวณชุมชนไทยอิสลามรอบมหาวิทยาลัยราชภัฏ
 บ้านสมเด็จเจ้าพระยา

การอภิปรายผล

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกที่นิยมนำมาใช้เป็น โพรไบโอติกส่วนใหญ่จะเป็นสายพันธุ์แบคทีเรียพวก แลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) และไบฟิโดแบคทีเรีย (*Bifidobacterium*) สายพันธุ์ที่มีการใช้กันไม่มากจะเป็น สายพันธุ์แบคทีเรียพวกบาซิลลัส (*Bacillus*) เอนเทอโรคอคคัส (*Enterococcus*) สเตรปโตคอคคัส (*Streptococcus*) รวมถึงแลคโตคอคคัส (*Lactococcus*) และเอสเชอริเชีย

(*Escherichia*) รวมถึงยังมีการใช้ยีสต์ *Saccharomyces boulardii* เป็นโพรไบโอติกในคนเช่นเดียวกัน (Iannitti and Palmieri, 2010; Pavlovic et al., 2012) มีรายงานว่าประสิทธิภาพของโพรไบโอติกจะมีความจำเพาะกับ ประชากรหรือสภาวะเป้าหมาย เนื่องจากความหลากหลาย ของเชื้อประจำถิ่นในทางเดินอาหาร พฤติกรรมการกิน อาหาร และปฏิสัมพันธ์ที่จำเพาะระหว่างโฮสต์และจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงมีคำแนะนำว่าสายพันธุ์ของโพรไบโอติกควรจะ

ถูกทำการศึกษาในประชากรเดียวกันกับที่แยกเชื้อนั้นมาได้ (Kaushik et al., 2009)

ขั้นตอนแรกสุดในการได้มาของสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก คือ จะต้องทำการเก็บเชื้อจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี การเก็บเชื้อมีหลายวิธีขึ้นอยู่กับตำแหน่งของเชื้อที่จะทำการเก็บ ซึ่งจะใช้วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการเก็บที่ยากง่ายแตกต่างกันออกไป เมื่อเก็บเชื้อได้แล้วจะต้องทำการแยกให้เป็นเชื้อเดี่ยวก่อนที่จะนำไปเก็บรักษาต่อไป หลังจากนั้นเชื้อที่แยกได้จะสามารถนำไปใช้เพื่อทดสอบในด้านอื่นๆ ต่อไป

งานวิจัยนี้ได้คัดแยกและเก็บรวบรวมแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์ไทยจากอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดีโดยวิธีไม่ป้ายลำคอ โดยทำการเก็บเชื้อจากอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดีทั้งในบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาและบริเวณชุมชนที่ติดกับมหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยาซึ่งประกอบด้วยสองชุมชน คือ ชุมชนไทยพุทธและชุมชนไทยอิสลาม เชื้อที่แยกได้เหล่านี้ถูกนำไปศึกษาเบื้องต้นในด้านลักษณะโคโลนีของเชื้อ การติดสีแกรม และค่า pH ของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจากผลการศึกษา สามารถแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้ทั้งหมด 188 เชื้อ จากอาสาสมัครรวมทั้ง 3 กลุ่ม เป็นจำนวน 232 คน โดยพบว่าลักษณะของเชื้อในด้านลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม และค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 1) การวิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนเชื้อที่แยกได้ระหว่างกลุ่มของอาสาสมัคร พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2) อาจเนื่องมาจากประชากรเหล่านี้อยู่อาศัยในบริเวณใกล้เคียงกัน อาหารการกินคล้ายกันจึงทำให้มีเชื้อประจำถิ่นไม่แตกต่างกันได้ (Lloyd-Price et al., 2016) อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าเชื้อเหล่านี้จะมีลักษณะข้อมูลพื้นฐานคล้ายกันแต่การจะนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกอาจให้ผลแตกต่างกันได้ เนื่องจากความจำเพาะของสายพันธุ์ (Strain-specific) ส่งผลถึงคุณสมบัติทางชีวภาพที่แตกต่างกัน ถึงแม้จะเป็นเชื้อสปีชีส์เดียวกันแต่สายพันธุ์ (Strain) แตกต่างก็อาจให้ผลไม่เหมือนกันได้ (Ciorba, 2012) ดังนั้นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกเหล่านี้จึงจำเป็นต้องนำไปทดสอบเพื่อค้นหาสายพันธุ์ที่ดีที่สุดต่อไป

เชื้อบางส่วนที่แยกได้จากอาสาสมัครไม่สามารถนำไปแยกต่อเป็นเชื้อเดี่ยวได้ เนื่องจากเชื้อเจริญขึ้นบนอาหารได้ช้า มีจำนวนโคโลนีน้อย และตายลงก่อนทำให้ไม่สามารถ Subculture ต่อไปได้ จึงเป็นสาเหตุให้ได้จำนวนเชื้อทั้งหมด (188 เชื้อ) น้อยกว่าจำนวนอาสาสมัครทั้งหมด (232 คน) เมื่อนำมาคำนวณเป็นร้อยละของเชื้อที่แยกได้จากจำนวนอาสาสมัครทั้งหมด มีค่าเท่ากับร้อยละ 81.03

งานวิจัยนี้จึงมีงบประมาณจำกัดจึงไม่สามารถระบุสายพันธุ์ (Identification) ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้อย่างไรก็ตาม อาหาร MRS ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ไม่ใช่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกอาจเจริญเติบโตได้ช้ากว่าหรือไม่เจริญเติบโตในอาหารนี้เนื่องจากสารอาหารไม่เหมาะสม และสามารถแยกเชื้อกลุ่มอื่นที่ไม่ใช่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกออกจากกันได้โดยอาศัยลักษณะโคโลนีที่ต่างกันออกไป รวมถึงการย้อมสีแกรม (Corry et al., 2003)

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกเหล่านี้เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากคนไทย จึงมีความเหมาะสมต่อคนไทยมากกว่าสายพันธุ์ต่างชาติ งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยที่มีเป้าหมายสุดท้าย คือ การนำแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกไปใช้ในการลดระดับคอเรสเตอรอลในคนไทยที่มีภาวะคอเรสเตอรอลสูง ซึ่งเป็นการเสริมสร้างสุขภาพที่ดีสำหรับคนไทยด้วยการลดอัตราการตายจากโรคหัวใจและหลอดเลือด และยังสามารถพัฒนาต่อยอดเพื่อการใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้ งานวิจัยนี้จึงเป็นขั้นตอนแรกสุดในการให้ได้มาของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์ไทย

โดยสรุป การศึกษาในครั้งนี้สามารถแยกและเก็บรวบรวมแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์ไทยได้ทั้งหมด 188 เชื้อ โดยวิธีไม่ป้ายลำคอ เชื้อเหล่านี้จะถูกนำไปศึกษาเพื่อค้นหาสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นโพรไบโอติกในด้านการลดระดับคอเลสเตอรอลต่อไป รวมถึงศึกษาเพิ่มเติมเพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมีและการวิเคราะห์ลำดับเบสจากส่วน 16S rDNA (16S rDNA sequencing) (Woo et al., 2008) นอกจากนี้ แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์ไทยเหล่านี้

จะสามารถนำไปศึกษาเพื่อทดสอบหาคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์อื่นๆ ได้อีกหลายประการ เช่น การต้านเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร การลดการอักเสบจากเชื้อก่อโรคในกระเพาะอาหารหรือลำไส้ เป็นต้น (Pandey et al., 2015)

ข้อเสนอแนะ

1. ข้อเสนอแนะการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
วิธีไม่ป้ายลำคอเป็นวิธีที่ทำได้ง่ายสามารถนำมาใช้ในการคัดแยกและเก็บรวบรวมแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์ไทย จากอาสาสมัครคนไทยที่มีสุขภาพดี

ทั้งหมด จำนวน 232 คน สามารถคัดแยกและเก็บรวบรวมแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์ไทยได้ทั้งหมด 188 เชื้อ เชื้อเหล่านี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาเพื่อค้นหาสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมเป็นโพรไบโอติกต่อไปได้

2. ข้อเสนอแนะการทำวิจัยในครั้งต่อไป

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์ไทยที่แยกได้เหล่านี้ไปศึกษาเพื่อค้นหาสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการลดระดับคอเลสเตอรอล และการศึกษาเพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อด้วยวิธีทางชีวเคมีและการวิเคราะห์ลำดับเบสจากส่วน 16S rDNA

เอกสารอ้างอิง

- Ahire, J. J., Bhat, A. A., Thakare, J. M., Pawar, P. B., Zope, D. G., Jain, R. M., and Chaudhari, B. L. (2012). Cholesterol assimilation and biotransformation by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnol Lett.* 34(1), 103–107.
- Barzegari, A., and Saei, A. A. (2012). Designing probiotics with respect to the native microbiome. *Future Microbiol.* 7(5), 571–575.
- Chandan, R. C. (1999). Enhancing market value of milk by adding cultures. *J Dairy Sci.* 82(10), 2245–2256.
- Ciorba, M. A. (2012). A gastroenterologist's guide to probiotics. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 10(9), 960–968.
- Corry, J. E. L., Curtis, G. D. W., and Baird, R. M. (Eds.). (2003). de man, rogosa and sharpe (MRS) agar. *Prog Ind Microbiol.* (37), 511–513.
- de Roos, N. M., and Katan, M. B. (2000). Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr.* 71(2), 405–411.
- Fischbach, F. T., and Dunning III, M. B. (2015). *A manual of laboratory and diagnostic tests*. 9th Edition. China : Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.
- Ha, C.G., Cho, J.K., Lee, C.H., Chai, Y.G., Ha, Y.A., and Shin, S.H. (2006). Cholesterol lowering effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from human feces. *J Microbiol Biotechnol.* 16(8), 1201–1209.
- Haberer, P., du Toit, M., Dicks, L. M., Ahrens, F., and Holzapfel, W. H. (2003). Effect of potentially probiotic lactobacilli on faecal enzyme activity in minipigs on a high-fat, high-cholesterol diet—a preliminary in vivo trial. *Int J Food Microbiol.* 87(3), 287–291.

- Hakalehto, E., Vilpponen-Salmela, T., Kinnunen, K., and von Wright, A. (2011). Lactic acid bacteria enriched from human gastric biopsies. *ISRN Gastroenterol.* (2011) :109–183.
- Iannitti, T., and Palmieri, B. (2010). Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clin Nutr.* 29(6) ,701–725.
- Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. (2001). Córdoba.
- Kaushik, J. K., Kumar, A., Duary, R. K., Mohanty, A. K., Grover, S., and Batish, V. K. (2009). Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. *PLoS One.* 4(12), e8099.
- Kawase, M., Hashimoto, H., Hosoda, M., Morita, H., and Hosono, A. (2000). Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. *J Dairy Sci.* 83(2), 255–263.
- Khonputsu, P., Veerman, J.L., Vathesatogkit, P., Vanavanan, S., Lim, S., Bertram, M., et al. (2010). Blood pressure, cholesterol and cardiovascular disease in Thailand. *Heart Asia.* 2(1), 42–46.
- Kontula, P., Suihko, M. L., Suortti, T., Tenkanen, M., Mattila-Sandholm, T., and von Wright, A. (2000). The isolation of lactic acid bacteria from human colonic biopsies after enrichment on lactose derivatives and rye arabinoxyloligosaccharides. *Food Microbiol.* 17(1), 13–22.
- Kumar, M., Nagpal, R., Kumar, R., Hemalatha, R., Verma, V., Kumar, A., et al. (2012). Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Exp Diabetes Res.* (2012): 902–917.
- Lim, H. J., Kim, S. Y., and Lee, W. K. (2004). Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. *J Vet Sci.* 5(4), 391–395.
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., and Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome Med.* 8(1), 51.
- Oner, O., Aslim, B., and Aydas, S. B. (2014). Mechanisms of cholesterol-lowering effects of lactobacilli and bifidobacteria strains as potential probiotics with their bsh gene analysis. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 24(1), 12–18.
- Pandey, K. R., Naik, S. R., and Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics– a review. *J Food Sci Technol.* 52(12), 7577–7587.
- Pavlovic, N., Stankov, K., and Mikov, M. (2012). Probiotics–interactions with bile acids and impact on cholesterol metabolism". *Appl Biochem Biotechnol.* 168(7), 1880–1895.
- Sadrzadeh-Yeganeh, H., Elmadfa, I., Djazayeri, A., Jalali, M., Heshmat, R., and Chamary, M. (2010). The effects of probiotic and conventional yoghurt on lipid profile in women. *Br J Nutr.* 103(12), 1778–1783.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Teng, J. L., Tse, H., and Yuen, K. Y. (2008). Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 14(10), 908–934.
- Zhang, H., and Cai, Y. (Eds.). (2014). *Lactic acid bacteria*. Springer.

