บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 ศึกษาผลการเสริมโยเกิร์ตต่อสมรรถภาพการผลิตและลดการเกิดโรคท้องร่วงในลูกสุกรดูดนม การทดลองที่ 2 ศึกษาผลการเสริมโยเกิร์ตต่อสมรรถภาพการผลิตและลดการเกิดโรคท้องร่วงในสุกรหย่านม

1. การทดลองที่ 1 ศึกษาผลการเสริมโยเกิร์ตต่อสมรรถภาพการผลิตและลดการเกิดโรคท้องร่วงในลูกสุกรดูดนม

1.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ผลิตโยเกิร์ต

- นมผงธรรมดาชนิดละลายทันทีตรามิชชั่น® (Instant full cream milk powder, Mission, New Zealand)
- นมผงขาดมันเนยที่ผ่านการทำให้แห้ง โดยกระบวนการ Spray drying ตรามิชชั่น® (Skimmed milk powder, Mission, New Zealand)
- โยเกิร์ตสำเร็จรูปตราดัชชี่®รสธรรมชาติ
- เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า ความละเอียดอ่านได้ 2 และ 4 ตำแหน่ง
- กระทะไฟฟ้า
- บีกเกอร์แก้ว (Pyrex, USA)
- โหลพลาสติก
- เทอร์โมมิเตอร์
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator) อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
- ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับเก็บรักษาโยเกิร์ต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงลูกสุกรดูดนม

- อุปกรณ์สำหรับป้อนโยเกิร์ต ได้แก่ กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตรต่อกับสายน้ำเกลือยาวประมาณ 5 เซนติเมตร
- ยาปฏิชีวนะ enrofloxacin ชนิดฉีดเข้ากล้ามเนื้อ
- เครื่องชั่งน้ำหนักลูกสุกร

1.2 สัตว์ทดลอง

ใช้ลูกสุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์ (ลาร์จไวท์ × แลนด์เรซ × ดูรอค) จำนวนทั้งหมด 65 ตัว โดยมีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 2.0 ± 0.5 กิโลกรัม แบ่งลูกสุกรออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 13 ตัว จากแม่สุกร 13 ตัว เริ่มทดลองเมื่อลูกสุกรอายุ 5 วันจนกระทั่งอายุที่ 28 วัน (โดยอายุที่ 5 - 21 วัน เป็นระยะดูดนมทำการเลี้ยงแบบปกติ คือให้ดูดนมแม่ในคอกคลอด ส่วนอายุที่ 22 - 28 วัน เป็นระยะหย่านม เลี้ยงแบบปกติ คือให้อาหารสำเร็จรูปชนิดอัดเม็ดที่ใช้ในฟาร์ม) ซึ่งแบ่งกลุ่มการทดลองดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (เลี้ยงแบบปกติ ไม่เสริมโยเกิร์ต)

กลุ่มที่ 2 เสริมด้วยโยเกิร์ตสำเร็จรูปดัชชี่®ในลูกสุกรอายุ 5 - 12 วัน โดยให้โยเกิร์ตในปริมาณ 10 มล. / ตัว / ครั้ง วันละ 2 ครั้ง (เช้า - เย็น)

กลุ่มที่ 3 เสริมด้วยโยเกิร์ตที่ผลิตโดยใช้โยเกิร์ตดัชชี่®เป็นหัวเชื้อ ในลูกสุกรอายุ 5 - 12 วัน โดยให้โยเกิร์ตในปริมาณ 10 มล. / ตัว / ครั้ง วันละ 2 ครั้ง (เช้า - เย็น)

กลุ่มที่ 4 เสริมด้วยโยเกิร์ตสำเร็จรูปดัชชี่® ในลูกสุกรอายุ 5 - 21 วัน โดยให้ปริมาณโยเกิร์ตตามอายุลูกสุกรดังนี้

- ที่อายุ 5 - 12 วัน ให้โยเกิร์ตปริมาณ 10 มล./ ตัว / ครั้ง วันละ 2 ครั้ง (เช้า - เย็น)
- ที่อายุ 13 - 21 วัน ให้โยเกิร์ตปริมาณ 15 มล./ ตัว / ครั้ง วันละ 2 ครั้ง (เช้า - เย็น)

กลุ่มที่ 5 เสริมด้วยโยเกิร์ตที่ผลิตโดยใช้โยเกิร์ตดัชชี่®เป็นหัวเชื้อ ในลูกสุกรอายุ 5 - 21 วัน โดยให้ปริมาณโยเกิร์ตตามอายุลูกสุกรดังนี้

- ที่อายุ 5 - 12 วัน ให้โยเกิร์ตปริมาณ 10 มล./ ตัว / ครั้ง วันละ 2 ครั้ง (เช้า - เย็น)
- ที่อายุ 13 - 21 วัน ให้โยเกิร์ตปริมาณ 15 มล./ ตัว / ครั้ง วันละ 2 ครั้ง (เช้า - เย็น)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design ; CRD) โดยลูกสุกร 5 ตัว ในแต่ละครอกจะถูกจัดให้เข้าแต่ละกลุ่มทดลอง (ใช้ลูกสุกรทั้งหมด 13 ครอก) ให้โยเกิร์ตวันละ 2 ครั้ง (เช้า - เย็น) โดยใช้กระบอกฉีดยาต่อกับสายน้ำเกลือป้อนให้ลูกสุกรกิน (ภาพที่ 6 และ 7)

ถ้าหากในระหว่างที่ทำการทดลองลูกสุกรมีอาการท้องร่วง จะรักษาโดยใช้ยา enrofloxacin แบบฉีดเข้ากล้ามเนื้อ โดยให้ปริมาณยา 2.5 มก./กก. เป็นเวลา 5 วัน ถ้าลูกสุกรอาการท้องร่วงไม่ดีขึ้นจะทำการเปลี่ยนไปใช้ยาต้านจุลชีพตัวอื่นแทน และทำการบันทึกข้อมูลไว้เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

1.4 โยเกิร์ตที่ใช้ในงานทดลอง

โยเกิร์ตที่นำมาใช้ในงานทดลองมี 2 สูตร คือ

สูตรที่ 1 คือ โยเกิร์ตสำเร็จรูปรสธรรมชาติในรูปแบบการค้าตราดัชชี่® ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* และเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์จะมีปริมาณเท่ากับ 2.0×10^9 cfu / ml หรือ 9.30 log cfu / g (ทัศนีย์ และคณะ, 2548)

สูตรที่ 2 คือ โยเกิร์ตที่ผลิตขึ้นเองโดยใช้โยเกิร์ตดัชชี่®เป็นหัวเชื้อ ซึ่งมีวิธีการผลิต ดังนี้

เตรียมน้ำนมโดยละลายนมผงธรรมดาชนิดละลายทันที 15.5 เปอร์เซ็นต์ หางนมผง 10.0 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำสะอาด 74.5 เปอร์เซ็นต์ นำน้ำนมที่ได้ไปทำการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการลดอุณหภูมิลงให้เหลือ 40 องศาเซลเซียส ทำการเติมโยเกิร์ตตราดัชชี่® ในปริมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็งประมาณ 10 นาที เพื่อเป็นการน็อคเชื้อไม่ให้เจริญอีก แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อายุการเก็บรักษาอยู่ได้ไม่เกิน 2 สัปดาห์ (ดัดแปลงจาก ภวัต, 2544) โยเกิร์ตที่ผลิตขึ้นเองโดยใช้โยเกิร์ตดัชชี่®เป็นหัวเชื้อ จะมีเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* เป็นส่วนประกอบ และเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์จะมีปริมาณเท่ากับ 2.3×10^9 cfu / ml หรือ 9.36 log cfu / g (ทัศนีย์ และคณะ, 2548)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.5 การบันทึกข้อมูล

เริ่มบันทึกข้อมูลของลูกสุกรตั้งแต่ลูกสุกรอายุ 5 วัน จนกระทั่งลูกสุกรอายุ 28 วัน (โดยอายุที่ 5 - 21 วัน เป็นระยะดูดนม ส่วนอายุที่ 22 - 28 วัน เป็นระยะหย่านม)

1.5.1 บันทึกอัตราการเจริญเติบโตของลูกสุกร โดยการชั่งน้ำหนักของลูกสุกรทุกตัวอายุที่ 5, 8, 12, 15, 18, 21, 24, 28 วัน

1.5.2 บันทึกข้อมูลจำนวนลูกสุกรที่แสดงอาการท้องร่วงในช่วงที่ทำการวิจัย (อายุที่ 5 - 28 วัน)

1.5.3 บันทึกลักษณะสุขภาพของลูกสุกรในระหว่างทำการทดลอง โดยทำการบันทึกแบ่งเป็นลักษณะต่างๆ ดังนี้ (ภาพประกอบในภาคผนวก ก)

- ลักษณะความสมบูรณ์แข็งแรงของลูกสุกร แบ่งเป็น 3 ระดับ
  - G1 = สมบูรณ์ แข็งแรง วิ่ง กระตือรือร้นดี
  - G2 = เริ่มซึม เดินได้ น้ำหนักลดลงเล็กน้อย
  - G3 = เหงาหงอย เดินโซเซไม่กระตือรือร้น น้ำหนักลดมาก
- ลักษณะขนของลูกสุกร แบ่งออกเป็น 4 ระดับ
  - H1 = ขนมันเงา เรียบสะอาด
  - H2 = ขนเรียบสะอาด ไม่มันเงา
  - H3 = ขนกระด้าง ไม่เรียบ ไม่มันเงา
  - H4 = ขนหยองชี้ฟู ไม่มันเงา
- ลักษณะสีของมูลลูกสุกร โดยแบ่งเป็น 5 ระดับ ดังนี้
  - A1 = สีดำ
  - A2 = สีดำ - เทา
  - A3 = สีเทา
  - A4 = สีเทา - เหลือง
  - A5 = สีเหลือง
- ลักษณะรูปร่างของมูลลูกสุกร โดยแบ่งเป็น 5 ระดับ
  - 1 = อ่อนตัว คงรูป เป็นพวง
  - 2 = อ่อนตัว คงรูป ไม่เป็นพวง
  - 3 = เหลวข้น
  - 4 = เหลว
  - 5 = เหลวเป็นน้ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นนำค่าระดับคะแนนของสีและรูปร่างลักษณะของมูลที่ได้มาคำนวณอัตราการเกิดท้องร่วง โดยคำนวณจากวันที่เกิดอาการท้องร่วง ซึ่งถือว่ามูลที่มีลักษณะรูปร่างระดับคะแนน 3 - 5 เป็นลักษณะท้องร่วงที่เกิดขึ้นในลูกสุกร

ภาพที่ 6 แสดงการป้อนโยเกิร์ตให้กับลูกสุกรดูดนม

ภาพที่ 7 แสดงอุปกรณ์สำหรับการป้อนโยเกิร์ต โดยใช้กระบอกฉีดยาต่อกับสายน้ำเกลือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การทดลองที่ 2 ศึกษาผลการเสริมโยเกิร์ตต่อสมรรถภาพการผลิตและลดการเกิดโรคท้องร่วงในสุกรหย่านม

2.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ผลิตโยเกิร์ต (เช่นเดียวกับข้อ 1.1.1)

2.1.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงสุกร

- รางอาหารแบบแขวน สำหรับใส่โยเกิร์ตให้กับสุกร
- กระบอกฉีดยาขนาด 10 มิลลิลิตร ไว้สำหรับวัดปริมาณโยเกิร์ตให้กับสุกร
- อุปกรณ์ช่วยในการเลี้ยงสุกร เช่น ที่ตักอาหาร ถังเก็บอาหาร
- เครื่องผสมอาหารสุกรถังนอนขนาดความจุ 100 กิโลกรัม
- ยา enrofloxacin ชนิดฉีดเข้ากล้ามเนื้อ
- เครื่องชั่งน้ำหนักลูกสุกร

2.1.3 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่างมูลสุกร

- ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อ
- ถุงพลาสติก
- กระติกใส่น้ำแข็ง
- น้ำยาฆ่าเชื้อโรค สำหรับทำความสะอาดบริเวณทวารของสุกร

2.1.4 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

- อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ (media) (แสดงไว้ในภาคผนวก ก) และสารละลายสำหรับเจือจางตัวอย่างมูล บีกเกอร์สแตนเลสขนาด 2 ลิตร
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator) อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส
- จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dishes)
- ปิเปต (Pipett) ขนาด 1 มิลลิลิตร
- ขวดแก้วฝาเกลียว ขนาด 500 มิลลิลิตร (Schott Duran, Germany)
- หลอดทดลอง ขนาด 16 × 150 มิลลิเมตร
- เครื่อง Homogenizer
- หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 สัตว์ทดลอง

ใช้ลูกสุกรหย่านมลูกผสม 3 สายพันธุ์ (ลาร์จไวท์ × แลนด์เรซ × ดูรอค) หย่านมเมื่ออายุ 21 วัน จำนวน 50 ตัว (เพศผู้และเพศเมียแต่ละกลุ่มจำนวนเท่าๆ กัน) มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 5.5 ± 0.5 กิโลกรัม สุ่มสุกรออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ทำการเลี้ยงบนกรงๆ ละ 2 ตัวเป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ โดยแบ่งกลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ให้อาหารฐานเพียงอย่างเดียวเป็นกลุ่มควบคุม

กลุ่มที่ 2 ให้อาหารฐาน และเสริมโยเกิร์ตสำเร็จรูปดัชชี่® ที่สุกรอายุ 21 - 28 วัน

กลุ่มที่ 3 ให้อาหารฐาน และเสริมโยเกิร์ตที่ผลิตโดยใช้โยเกิร์ตดัชชี่®เป็นหัวเชื้อ ที่สุกรอายุ 21 - 28 วัน

กลุ่มที่ 4 ให้อาหารฐาน และเสริมโยเกิร์ตสำเร็จรูปดัชชี่® ที่สุกรอายุ 21 - 35 วัน

กลุ่มที่ 5 ให้อาหารสำเร็จรูปชนิดอัดเม็ดที่ใช้ในฟาร์ม (KT FEED®)

2.3 อาหารทดลอง

อาหารทดลองที่ใช้ในกลุ่มที่ 1 - 4 เป็นอาหารสุกรหย่านมที่ทำการผสมขึ้น การประกอบสูตรอาหารจะใช้แหล่งวัตถุดิบหลัก คือ ข้าวโพด และกากถั่วเหลือง (ดังตารางที่ 2) โดยคำนวณคุณค่าทางโภชนะตามความต้องการของสุกรหย่านมตามคำแนะนำของ NRC (1998) ส่วนอาหารทดลองในกลุ่มที่ 5 เป็นอาหารสำเร็จรูปชนิดอัดเม็ดที่ใช้ในฟาร์มในรูปแบบการค้า (KT FEED®) โดยมีวัตถุดิบหลักเช่นเดียวกันกับอาหารทดลองในกลุ่มที่ 1 - 4 แต่จะมีการเพิ่มยาปฏิชีวนะ และเคมีภัณฑ์สำหรับรักษาคุณภาพอาหาร คือ Butylated Hydroxy Toluene (BHT) 0.01 เปอร์เซ็นต์ หรือ Ethoxyquin 0.015 เปอร์เซ็นต์ โดยมีโปรตีนไม่น้อยกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ไขมันไม่น้อยกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ กากไม่น้อยกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ และมีความชื้นไม่มากกว่า 13 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของอาหารสุกรหย่านมในกลุ่มที่ 1 - 4

วัตถุดิบ	g kg^{-1} diet	คุณค่าทางโภชนะ	% as fed basis
ข้าวโพด	33.8	โปรตีน	20.00
กากถั่วเหลือง (44 % CP)	35.0	พลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้; kcal kg^{-1}	3260
ปลายข้าว	15.0	เยื่อใย	3.50
รำข้าว	10.0	แคลเซียม	0.82
หางเนย	1.0	ฟอสฟอรัส	0.39
หินปูน	0.8	ไลซีน	1.19
ไดแคลเซียม ฟอสเฟต (18 % P)	1.6		
น้ำมันพืช	2.0		
เกลือ	0.3		
Vitamin-mineral premix[1/]	0.5		
รวม ; กิโลกรัม	100		

[1/] Vit.A 3,000,000 IU; Vit.D_3 600,000 IU; Vit.E 10,000 IU; Vit. K_3 0.8g; Vit.B_1 1.6g; Vit. B_2 1.6g; Vit.B_3 0.4g; Vit.B_{12} 8.0g; Pantotenic acid 5.0g; Niacin 12.0g; Biotin 0.01g; Folic acid 0.4g; Cu 35.0g; Zn 24.0g; Mn 12.0g; Fe 40g; Co 0.2g; Se 0.04g and T 0.40g

ที่มา : แสงเดือน (2547)

2.4 วิธีการทดลอง

ใช้ลูกสุกรหย่านมที่อายุ 21วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design ; CRD) ใช้ลูกสุกรหย่านมกลุ่มละ 10 ตัว (5 ซ้ำๆ ละ 2 ตัว) สุ่มลูกสุกรหย่านมที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 5.5 ± 0.5 กิโลกรัม เลี้ยงบนกรงๆ ละ 2 ตัว สุกรหย่านมแต่ละกรงจะถูกสุ่มเข้าในแต่ละกลุ่มทดลอง โดยสุกรในกลุ่มที่ 2 และ 3 จะได้รับการเสริมโยเกิร์ต ตั้งแต่อายุที่ 21 ถึง 28 วัน หลังจากอายุที่ 28 วัน สุกรจะได้รับอาหารปกติที่ไม่มีการเสริมโยเกิร์ต ส่วนในกลุ่มที่ 4 จะได้รับการเสริมโยเกิร์ตสำเร็จรูปดัชชี่® ตั้งแต่อายุที่ 21 ถึง 35 วัน และหลังจากนั้นจะได้รับอาหารปกติที่ไม่มีการเสริมโยเกิร์ต โดยสุกรหย่านมในกลุ่มที่ 2 - 4 จะได้รับโยเกิร์ตในรางอาหารแบบแขวนให้สุกรเลียกินเอง (ภาพที่ 8) ในปริมาณ 30 มล./ตัว/ครั้ง วันละ 2 ครั้ง (เช้า - เย็น) ทำการให้อาหารสุกรหย่านมวันละ 3 ครั้ง คือ 6.00 น. 12.00 น. 18.00 น. แต่ละกลุ่มการทดลองสุกรจะได้รับอาหารและน้ำดื่มเต็มที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ถ้าหากในกรณีมีลูกสุกรเกิดอาการท้องร่วงในระหว่างทำการทดลอง จะทำการรักษาโดยใช้ยา enrofloxacin แบบฉีดเข้ากล้ามเนื้อ โดยให้ปริมาณยา 2.5 มก./กก. เป็นเวลา 5 วัน ถ้าสุกรอาการท้องร่วงไม่ดีขึ้นหลังจาก 5 วันจะทำการเปลี่ยนไปใช้ยาต้านจุลชีพตัวอื่นแทน และทำการบันทึกข้อมูลไว้เพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

ภาพที่ 8 แสดงวิธีการให้โยเกิร์ตแก่สุกรหย่านมโดยใส่ในรางอาหารแบบแขวน

2.5 การเตรียมโยเกิร์ต

โยเกิร์ตที่นำมาใช้ในการทดลองที่ 2 เป็นโยเกิร์ตชนิดเดียวกันกับการทดลองที่ 1

2.6 การบันทึกข้อมูล

เริ่มบันทึกข้อมูลของลูกสุกรตั้งแต่สุกรอายุ 21 วันจนกระทั่งสุกรอายุ 56 วัน

- บันทึกน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น โดยชั่งน้ำหนักของลูกสุกรทุกตัวทุกๆสัปดาห์
- บันทึกปริมาณอาหารที่กิน ปริมาณอาหารที่เหลือและตกหล่นในแต่ละวัน เพื่อใช้ในการคำนวณหาสมรรถภาพการผลิต ได้แก่ อัตราการเจริญเติบโต (Average daily gain; ADG) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (Feed conversion ratio; FCR) ปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อวัน (Average daily feed intake; ADFI)
- บันทึกข้อมูลจำนวนสุกรที่แสดงอาการท้องร่วงในระหว่างทำการทดลอง
- บันทึกลักษณะสุขภาพของสุกรในระหว่างช่วงเวลาที่ทำการทดลอง โดยทำการบันทึกตามระดับคะแนนที่ได้กล่าวในการทดลองที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.7 การเก็บตัวอย่างมูลสุกร

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างมูลสดในตอนเช้า กลุ่มละ 2 ตัว เพื่อใช้ตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณของจุลินทรีย์ในลำไส้สุกร (ดัดแปลงจาก Baum and Harris, nodate ; Campbell *et al*., 1997) โดยเก็บมูลสุกรทุกกลุ่มตอนเช้าที่อายุที่ 21, 23, 25, 28, 30, 32, 35, 37, 40, 44, 52, 56 วัน รวมเก็บตัวอย่างมูลสุกรทุกกลุ่มที่ใช้ในการตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์จำนวน 120 ตัวอย่าง

วิธีการเก็บมูลสุกรโดยใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อสอดเข้าช่องทวารหนักของสุกร เพื่อกระตุ้นให้สุกรถ่ายมูลออกมา แล้วเก็บมูลสุกรที่ถ่ายออกมาโดยใช้ถุงพลาสติกรองรับไม่ให้มูลตกหล่นลงพื้น เมื่อได้แล้วปิดปากถุงให้แน่นเพื่อป้องกันสิ่งเจือปน หลังจากนั้นนำมาเก็บที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส แล้วรีบนำไปตรวจนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ห้องปฏิบัติการต่อไป (ภาพที่ 9)

ภาพที่ 9 แสดงวิธีการเก็บมูลสุกรหย่านม

2.8 การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

2.8.1 วิเคราะห์หาจำนวนแลคโตบาซิลลัส และอี.โคไลในมูลสุกร

ใช้วิธีการทำ Dilution plate count เป็นเทคนิคการทำให้เชื้อหรือตัวอย่างเจือจางลง (dilution) โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0.85 เปอร์เซ็นต์ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร จะได้เป็น saline sulution จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อภายใต้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วใช้ปิเปต (Pipett) ดูด saline solution ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใส่ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในปริมาตรหลอดละ 9 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.8.1.1 ทำการเจือจางตัวอย่าง

นำมูลสดประมาณ 1 กรัม มาทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในหลอดทดลองที่มี saline solution ภายใต้เครื่อง homogenizer (ภาพที่ 10) จะได้ตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 หรือ 10^{-1} จากนั้นใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่มีความเจือจาง 1:10 หรือ 10^{-1} ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มี saline solution 9 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันจะได้ตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 หรือ 10^{-2} ทำการเจือจางเช่นนี้ไปเรื่อยๆ จนถึงอัตราส่วนที่ 1:1,000,000,000 หรือ 10^{-9}

2.8.1.2 ทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้วิธีการ Pour - plate (Harrigan and McCance, 1966)

- ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างมูลที่เจือจางในสารละลายที่มีอัตราส่วน 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9} ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ความเจือจางละ 2 จาน
- นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิด คือ deMan Rogosa Sharpe agar (MRS - agar) สำหรับแลคโตบาซิลลัส Eosin Methylene Blue agar (EMB - agar) สำหรับอี.โคไล โดยอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดจะต้องผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ภายใต้หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อ โดยมีอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 47 ± 1 องศาเซลเซียส จานละประมาณ 13 มิลลิลิตร ทำการหมุนจานเลี้ยงเชื้อให้อาหารเลี้ยงเชื้อกระจายทั่วจาน หลังจากนั้นวางทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว (ภาพที่ 11)

2.8.1.3 ทำการบ่มเชื้อ

- บ่มเชื้อของแลคโตบาซิลลัสไว้ในสภาพไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน
- บ่มเชื้อของอี.โคไลไว้ในสภาพที่มีอากาศที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.8.1.4 การนับโคโลนี

หลังบ่มเชื้อครบตามกำหนดเวลาแล้วตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30 - 300 โคโลนี แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณเชื้อ รายงานผลเป็นจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในรูปโคโลนี ต่อ ตัวอย่างมูลสุกร 1 กรัม (Sneath *et al*., 1986; IDF, 1997) โดยมีสมการ ดังนี้

$$\text{ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ต่อ 1 กรัม} = \frac{\sum C}{(n_1 + 0.1n_2)d} \quad \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots(1)$$

โดยที่

$\sum C$ คือ ผลรวมของโคโลนีที่นับได้บนจานเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนี 30 - 300 โคโลนี

n_1 คือ จำนวนจานเลี้ยงเชื้อในความเจือจางแรกที่สามารถนับได้

n_2 คือ จำนวนจานเลี้ยงเชื้อในความเจือจางที่สองที่สามารถนับได้

d คือ ความเจือจางแรกที่สามารถนับได้

ภาพที่ 10 แสดงการนำมูลสดผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันในหลอดทดลองที่มี saline solution ภายใต้เครื่อง homogenizer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 11 แสดงการเทอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อ (ภาพซ้าย)
และการทำ Pour - plate (ภาพขวา)

2.8.2 การจำแนกเชื้อแบคทีเรีย (identification of bacteria)

เป็นการทดสอบลักษณะโคโลนีที่ได้จากการเพาะเชื้อว่าเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อนั้นๆ หรือไม่ โดยใช้การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (biochemical test) ซึ่งจะนำโคโลนีที่ได้จากการเพาะเชื้อในหัวข้อ 2.8.1.4 มาทำการทดสอบ โดยสุ่มทำการทดสอบทั้งหมด 2 ครั้งๆ ละ 2 ตัวอย่าง คือนำโคโลนีที่ได้จากการเพาะเชื้อจากมูลของอายุลูกสุกรที่ 21 และ 35 วัน ทำการทดสอบดังนี้

2.8.2.1 การจำแนกเชื้อแลคโตบาซิลลัส จากวิธีของ Leboffe and Burton (1995) ; นันทนา (2537); ดวงพร (2537)

2.8.2.1.1 การตรวจสอบการติดสีแกรม : เขี่ยเชื้อจากจานเพาะเชื้อมา smear ลงบนแผ่นสไลด์ จากนั้น fix เชื้อโดยนำแผ่นสไลด์ที่ smear เชื้อ แล้วไปผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2 - 3 ครั้ง หยดสีคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) ทิ้งไว้ 1 นาที เมื่อครบเวลาเทสีทิ้ง จากนั้นหยดลูกอลไอโอดีน (lugol's iodine) ทิ้งไว้ 1 นาที และหยดเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงย้อมด้วยสีซาฟรานิน (safranin) เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจสอบลักษณะเซลล์ การจัดเรียงตัวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าเป็นแบคทีเรียแกรมลบจะให้สีแดง แกรมบวกจะให้สีม่วง

2.8.2.1.2 การทดสอบ Catalase Test : ใส่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วสังเกตดู

การอ่านผล : ผลบวก มีฟองก๊าซเกิดขึ้นทันที

ผลลบ ไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.8.2.1.3 การทดสอบ Motility Test : เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน Motility test medium โดย stab ตรงๆ เพียงครั้งเดียว ประมาณ 2 / 3 ของส่วนสูงของอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 - 24 ชั่วโมง อ่านผล ถ้ายังให้ผลลบ ให้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องต่อไปอีก 1 - 2 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงเป็นระยะๆ

การอ่านผล : ผลบวก เชื้อจะเจริญออกมานอกรอย stab หรือไม่มีรอยการเจริญที่ชัดเจนบริเวณรอยที่ทำการ stab แต่อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหลอดขุ่นกว่าเดิม ถ้าหากผลเป็นลบ จะเห็นการเจริญของเชื้ออย่างชัดเจน ที่บริเวณรอย stab โดยเห็นขอบเขตของเชื้อที่เจริญอย่างชัดเจน แม้จะบ่มต่อไปอีก 2 สัปดาห์ก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

2.8.2.2 การจำแนกเชื้ออี.โคไล จากวิธีของ Leboffe and Burton (1995) ; นันทนา (2537); ดวงพร (2537)

2.8.2.2.1 การตรวจสอบการติดสีแกรม (ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 2.8.2.1.1)

2.8.2.2.2 การทดสอบ Catalase Test (ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 2.8.2.1.2)

2.8.2.2.3 การทดสอบ Motility Test (ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 2.8.2.1.3)

2.8.2.2.4 การทดสอบ Methyl Red - Vogesproskauer Test (MR - VP Test) : เพาะเชื้อลงใน MR - VP broth 2 หลอด มีอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดละ 1 มิลลิลิตร และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 - 3 วัน เพื่อให้แน่ใจว่าน้ำตาลกลูโคสถูกเมตาโบไลท์ (metabolite)

MR - Test หยด Methyl red reagent 5 หยด ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญอยู่ สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้น

VP - Test ใส่ reagent ตัวแรก (alpha - naphthol) ลงไป 0.6 มิลลิลิตร เขย่าหลอด แล้วใส่ reagent ตัวที่สอง (KOH) 0.2 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ วางทิ้งไว้ 15 นาที สังเกตการเกิดสีแดง ถ้ายังไม่เกิดขึ้นทิ้งต่อไปอีก 45 นาที ดูผล

การอ่านผล : ผลบวก MR - Test เปลี่ยนเป็นสีแดง, VP - Test เกิดสีแดงให้เห็นภายใน 15 - 45 นาที ถ้าหากผลเป็นลบ MR - Test เปลี่ยนเป็นสีเหลือง, VP - Test ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

2.8.2.2.5 การทดสอบ Citrate Utilization Test : เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Citrate Agar หรือ Simmons บ่มไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผล

การอ่านผล : ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญ เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินถ้าหากผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญไม่เปลี่ยนสี สีคงเดิม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.8.2.2.6 การทดสอบ Triple Sugar Iron (TSI) agar : เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบ โดยการขีดเชื้อบนวุ้นของ TSI agar ให้ทั่วและแทง (stab) ปลายเข็มที่ขีดเชื้อในตอนแรกลงลึกประมาณ 2 ใน 3 ของอาหารเลี้ยงเชื้อจนถึงก้นหลอด บ่มไว้ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง อ่านผล

การอ่านผล : ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว บนผิววุ้นจากสีแดงส้มจะเปลี่ยนไปเป็นสีแดงเข้ม (alkaline หรือ K) ส่วนที่ก้นหลอด (butt) เปลี่ยนจากสีแดงส้มไปเป็นสีเหลือง (acid หรือ A) หรืออ่านผลว่า K / A ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักย่อยทั้งน้ำตาลกลูโคส และแลคโตส หรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสร่วมกับซูโคส หรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลได้ทั้ง 3 ชนิด ได้ทั้งบนผิว (slant) และที่ก้น (butt) ของหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเหลืองทั้งหลอด ให้อ่านผลเป็น A / A แต่ถ้าหากแบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดใดๆ เลย มีอยู่ 3 แบบ คือ N / N, K / N, K / K (N : ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ K : เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม)

2.8.2.2.7 การทดสอบ Indole Test : เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน Tryptophan broth บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการหยด Kovac's reagent โดยการหยด Kovac's ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 หยด เขย่าเบาๆ สังเกตสีที่เกิดขึ้น

การอ่านผล : ผลบวก สีของ reagent เปลี่ยนเป็นสีแดง

ผลลบ สีของ reagent ไม่เปลี่ยนแปลง

2.8.2.2.8 การทดสอบ MIL Media : บ่มเพาะเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงบน MIL โดยการแทงเข็มเขี่ยเชื้อลง ในหลอดตรงๆ บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล

การอ่านผล : สีม่วง (slant) / สีเหลือง (butt) : ไม่มีการผลิตเอนไซม์ lysine decarboxylase และ lysine deaminase

สีม่วง / สีม่วง : มีการผลิตเอนไซม์ lysine decarboxylase แต่ไม่มีการผลิตเอนไซม์ lysine deaminase

สีแดง / เหลือง : มีการผลิตเอนไซม์ lysine deaminasec แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ lysine decarboxylase

สีดำทั้งหลอด : มีการผลิตให้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลที่ได้จากการทดสอบทางปฏิกิริยาทางชีวเคมี (biochemical test) จะนำมาเปรียบเทียบกับตารางจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ Bergey's manual (Sneath *et al*., 1986)

2.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลต่างๆที่ได้จากทั้ง 2 การทดลองโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design; CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (SAS, 2001) และวิเคราะห์ข้อมูลอัตราการเกิดโรคท้องร่วงของสุกรทั้ง 2 การทดลอง โดยวิธีไคสแควร์ (บุญธรรม, 2546) มีสมการดังนี้

$$\chi^2 = \frac{N(AD - BC)^2}{(A+B)(C+D)(A+C)(B+D)} \qquad \text{.....(2)}$$

โดยที่

N = จำนวนข้อมูลรวมทั้งหมด (A + B + C + D)

2.10 สถานที่ทำการวิจัย

- ฟาร์มสุกร ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
- ห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย สถานบริการสุขภาพสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.11 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัย

เดือนกรกฎาคม 2547 - มิถุนายน 2548

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved