บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

การศึกษาแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของพลู สารยูจีนอลมาตรฐาน และยาปฏิชีวนะต่อเชื้อซัลโมเนลล่าในมูลสุกร การทดลองที่ 2 การตรวจแยกซีโรไทป์ของเชื้อซัลโมเนลล่าและการศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบพลูและสารยูจีนอลมาตราฐานที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อซัลโมเนลล่า

การทดลองที่ 1 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของพลู สารยูจีนอลมาตรฐาน และยาปฏิชีวนะต่อเชื้อซัลโมเนลล่าในมูลสุกร

1.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงสุกร

- สารยูจีนอลมาตรฐาน
- ใบพลูสด
- ใบพลูแห้ง
- ยาปฏิชีวนะ tylosin ชนิดผสมอาหาร
- เครื่องชั่งน้ำหนักสุกร ขนาด 60 กิโลกรัม
- อุปกรณ์ช่วยในการเลี้ยงสุกร เช่น ที่ตักอาหาร ถังเก็บอาหาร
- เครื่องผสมอาหารสุกรถังนอนขนาดความจุ 100 กิโลกรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้เก็บตัวอย่างมูลสุกร

- ถุงมือแพทย์
- ถุงพลาสติก
- กระติกใส่น้ำแข็ง
- น้ำยาฆ่าเชื้อโรค (แอลกอฮอล์ 75%) สำหรับทำความสะอาดบริเวณทวารของสุกร

1.3 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1.3.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

เครื่องมือ	**ขนาด**	**บริษัท**	**ประเทศ**
1. Culture tube	13 x 100 mm.	Pyrex	USA
2. Culture tube	13 x 150 mm.	Pyrex	USA
3. Culture tube	16 x 125 mm.	Pyrex	USA
4. Duran bottle	100 ml.	Schott, Duran	Germany
5. Duran bottle	500 ml.	Schott, Duran	Germany
6. Duran bottle	1,000 ml.	Schott, Duran	Germany
7. Duran bottle	2,000 ml.	Schott, Duran	Germany
8. Hot plate	-	-	-
9. incubator	37 °C, 42 °C	Memmert	Germany
10. loop	Ø 3 mm.	-	-
11. Plastics Petri dish	Ø 90 mm.	Hycon	USA
12. Pipette	10 ml.	Jaytec	England
13. Pipette	25 ml.	Jaytec	England
14. Pipette tip	200 µl	Hycon	USA
15. Pipette tip	1,000 µl	Hycon	USA
16. Water bath	50 °C	Memmert	Germany

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3.2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัท
1. Brilliant Green Red Lactose Sucrose agar	Merck
2. Iodine	Merck
3. KOVACS ´s reagent	Merck
4. MIL Media (Motility Indole Lysine)	Difco
5. Nutrient agar	Merck
6. Nutrient broth	Difco
7. Rappaport - Vassiliadis broth	Merck
8. Tetrathionate broth	Merck
9. Triple Sugar Iron agar	Difco
10. Urea agar	Merck
11. XLT4 Agar Supplement	Merck
12. Xylose lysine Tergitol 4 agar	Merck

1.4 สัตว์ทดลอง

ใช้สุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์ (Large White x Lanrace x Duroc) อายุ 28 วัน จำนวน 50 ตัว (เพศผู้และเพศเมียในแต่ละกลุ่มเท่า ๆ กัน) โดยสุ่มสุกรออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว แต่ละกลุ่มเลี้ยงบนกรงแบบร่วมกันเป็นระยะเวลา 35 วัน โดยสุกรได้รับน้ำและอาหารอย่างเต็มที่ ให้อาหารวันละ 4 ครั้ง คือเวลา 06.00 น. 10.00 น. 14.00 น. และ18.00 น.

1.5 อาหารทดลอง

อาหารสุกรหย่านม ใช้แหล่งวัตถุดิบหลัก คือ ข้าวโพด และกากถั่วเหลือง (ดังตาราง 6) โดยคำนวณคุณค่าทางโภชนะตามความต้องการของสุกรหย่านมตามคำแนะนำของ NRC (1998) การให้อาหารทดลองสุกรแต่ละกลุ่มมีดังนี้ คือ

กลุ่มที่ 1 อาหารฐานเพียงอย่างเดียวเป็นกลุ่มควบคุม (control diet)

กลุ่มที่ 2 อาหารฐาน เสริมยาปฏิชีวนะ tylosin 5 ก. ผสมอาหารฐาน 1กก.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลุ่มที่ 3 อาหารฐาน เสริมสารยูจีนอลมาตรฐาน 0.004 มก./น้ำหนักตัวลูกสุกร 1 กก./วัน

กลุ่มที่ 4 อาหารฐาน เสริมใบพลูสด 25.60 มก./น้ำหนักตัวลูกสุกร1 กก./วัน

กลุ่มที่ 5 อาหารฐาน เสริมใบพลูแห้ง 1.91 มก./น้ำหนักตัวลูกสุกร1 กก./วัน

ปริมาณใบพลูสดและใบพลูแห้งที่เสริมมีปริมาณสารยูจีนอล 10 เท่าของสารยูจีนอลในสารสกัดหยาบจากใบพลูจากการทดสอบหาค่า Minimal inhibitory concentration (MIC) ของสารสกัดหยาบจากใบพลูในการยับยั้งการเจริญของเชื้อซัลโมเนลล่า และปริมาณสารยูจีนอลมาตรฐานที่เสริมมีปริมาณ 10 เท่าของสารยูจีนอลมาตรฐานจากการทดสอบหาค่า MIC ในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลล่า (พิมพ์ภัทรา, 2552)

ตาราง 6 ส่วนประกอบของอาหารสุกรหย่านม (อาหารฐาน)

วัตถุดิบ	**g kg^{-1} diet**	**คุณค่าทางโภชนะ**	**% as fed basis**
ข้าวโพด	33.8	โปรตีน	20.0
กากถั่วเหลือง	35.0	พลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ ; kcal kg^{-1}	3260
ปลายข้าว	15.0	เยื่อใย	3.50
รำข้าว	10.0	เคลเซียม	0.82
หางนม	1.0	ฟอสฟอรัส	0.39
หินปูน	0.8	ไลซีน	1.19
ไดแคลเซียฟอสเฟต (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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.6 วิธีการทดลอง

ใช้สุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์ (Large White x Lanrace x Duroc) อายุ 28 วัน จำนวน 50 ตัว (เพศผู้และเพศเมียในแต่ละกลุ่มเท่า ๆ กัน) โดยสุ่มสุกรออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว แต่ละกลุ่มให้อาหารและ เลี้ยงบนกรงแบบร่วมกันเป็นระยะเวลา 35 วัน เก็บมูลลูกสุกรปริมาณอย่างน้อย 1 กรัม ในวันที่ 0 และ 35 ของการทดลอง นำมูลที่ได้มาเพาะเลี้ยงเชื้อและตรวจนับจำนวนเชื้อซัลโมเนลล่า ในห้องปฏิบัติการเพื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อก่อนและหลังการทดลอง ด้วยวิธี most probable number method (MPN method) (McMeekin, 2003) วิธี MPN เป็นวิธีการที่เหมาะสมกับการตรวจเชื้อที่มีจำนวนน้อย (< 100 เซลล์/กรัม) และอ่านผล MPN ตามตารางมาตรฐานของ AOAC international (Cuniff,1998)

ในกรณีที่ลูกสุกรที่ใช้ในการทดลองเกิดอาการท้องร่วงจะไม่มีการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ

1.7 การบันทึกข้อมูล

- บันทึกน้ำหนักลูกสุกรเมื่อเริ่มต้นการทดลอง และชั่งน้ำหนักสัปดาห์ละครั้ง นาน 5 สัปดาห์ เพื่อคำนวนอัตราการเจริญเติบโต (Average daily gain; ADG)
- ชั่งปริมาณอาหารที่กิน ปริมาณที่กินเหลือ และตกหล่นในแต่ละวัน เพื่อคำนวณ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (Feed Conversion ratio; FCR)
- บันทึกอัตราการเกิดท้องร่วงของลูกสุกรกลุ่มต่างๆ ตลอดการทดลอง

1.8 การเก็บตัวอย่างมูลสุกร

เก็บมูลสดของลูกสุกรในตอนเช้าวันที่ 0 และวันที่ 35 ของการทดลอง วิธีการเก็บมูลสุกรโดยทำความสะอาดบริเวณทวารลูกสุกรด้วยสำลีชุบแอลกลฮอล์ 75 % แล้วนิ้วสอดเข้าช่องทวารหนักของสุกร เพื่อกระตุ้นให้สุกรถ่ายมูลออกมา แล้วเก็บมูลสุกรที่ถ่ายออกมาโดยใช้ถุงพลาสติกรองรับไม่ให้มูลตกหล่นลงพื้น ปิดปากถุงให้แน่นเพื่อป้องกันสิ่งเจือปน เก็บในกระติก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำแข็ง (อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส) นำไปเพาะเลี้ยงเชื้อและตรวจนับจำนวนเชื้อซัลโมเนลล่าในห้องปฏิบัติการ

2. การนับจำนวนและเพาะเลี้ยงเชื้อ

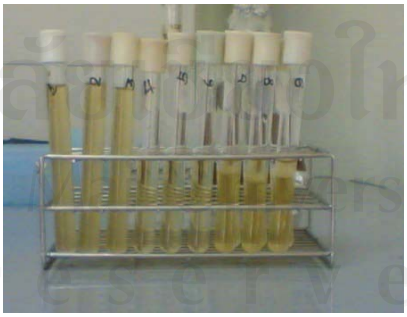
2.1 การตรวจนับจำนวนเชื้อซัลโมเนลล่า (ISO6579, 2002) ด้วยวิธี 3- tube MPN

นำตัวอย่างมูล 1 กรัมผสมกับ Nutrient Broth 99 ml คนให้เข้ากัน แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง (ภาพ 11) เตรียม NB ใส่หลอดทดลองทั้งหมด 9 หลอด แล้วดูดสารแขวนลอยมูลที่บ่มแล้ว ใส่ในหลอดทดลองดังนี้

- หลอดที่ 1-3 ใส่ NB 10 ml และดูดสารแขวนลอยมูลใส่หลอดละ 10 ml (ปริมาณ สารแขวนลอยมูล : NB ในอัตราส่วน 1:1)
- หลอดที่ 4-6ใส่ NB 9 ml และดูดสารแขวนลอยมูลใส่หลอดละ 1 ml (ปริมาณ สารแขวนลอยมูล: NBในอัตราส่วน 1:10)
- หลอดที่ 7-9ใส่ NB 9 ml และดูดสารแขวนลอยมูลจากหลอดที่ 4-6 ใส่หลอดที่ 7-9 ตามลำดับ หลอดละ 1 ml (ปริมาณ สารแขวนลอยมูล : NB ในอัตราส่วน 1:100) (ภาพ 12)

นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง การอ่านผลหลอดที่ NB ขุ่น บันทึกผล (ภาพ13) และขั้นตอนนี้จะเลือกหลอดที่ NB ที่มีการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย คืออาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากใสเป็นขุ่น แล้วทำการบันทึกผลที่ได้

ภาพ 11 ตัวอย่างมูล 1 กรัมผสมกับ Nutrient Broth (NB) 99 ml



ภาพ 12 ดูดสารแขวนลอยมูลใส่หลอด NB ที่เตรียมไว้ทั้ง 9หลอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 13 หลอดที่ให้ผลบวกต่อเชื้อซัลโมเนลล่าจะมีลักษณะขุ่น(หลอดด้านซ้าย)

2.2 การยืนยันผล MPN

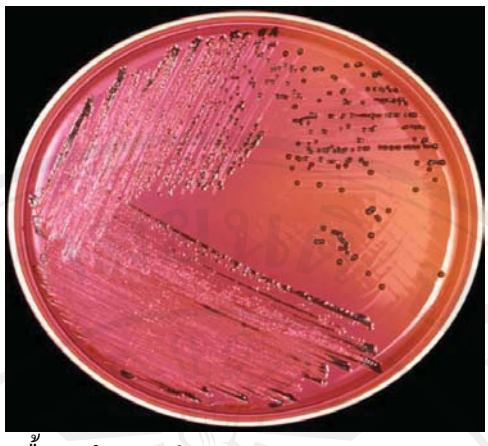
1. การเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว

ดูดสารแขวนลอยมูล ที่บ่มแล้วจากข้อ 2.1 โดยเลือกหลอดที่ให้ผลเป็นบวกต่อเชื้อซัลโมเนลล่า คืออาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากใสเป็นขุ่น หลอดละ 0.1 ml ใส่ลงใน Rappaport - Vassiliadis Broth (RV broth) 10 ml บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 18- 24 ชั่วโมง และ 1 ml ใส่ลงใน Tetrathionate Broth (TT broth) 10 ml บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง

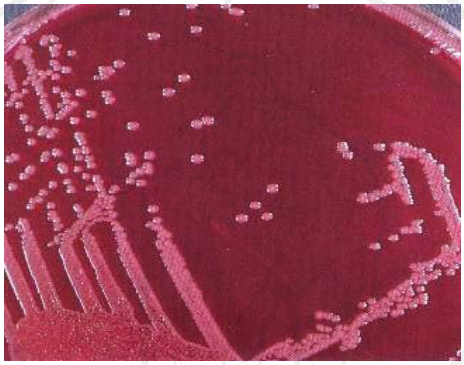
2. การแยกเชื้อบนอาหารชนิดแข็ง

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร จุ่มเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (RV และ TT) จากข้อที่ 1 เขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง คือ Xylose lysine Tergitol 4 agar (XLT4 agar) และ Brilliant Green Red Lactose Sucrose agar (BPLS agar) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแต่ละชนิด จะเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งทั้งสองชนิด แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง และบันทึกลักษณะโคโลนีที่ได้ โดยโคโลนีของเชื้อซัลโมเนลล่าบน XLT4 agar จะกลม นูน ใส กลางโคโลนีมีจุดสีดำ (สร้าง ไฮโดเจนซัลไฟต์ : H_2S) และอาหารรอบๆ โคโลนีจะเปลี่ยนเป็นสีแดง (ภาพ 14) และโคโลนีบน BPLS agar จะกลม นูนเล็กน้อย สีชมพู และสีของอาหารเลี้ยงเชื้อรอบๆ จะเปลี่ยนเป็นสีแดง หรือสีชมพู (ภาพ 15) จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ที่มีลักษณะดังกล่าวของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งทั้งสองชนิด มาป้ายลงบน NA แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 – 24 ชั่วโมง โคโลนีที่ได้จะกลม นูน สีขาวขุ่น (ภาพ 16) แล้วนำมาทดสอบเชื้อทางชีวเคมี

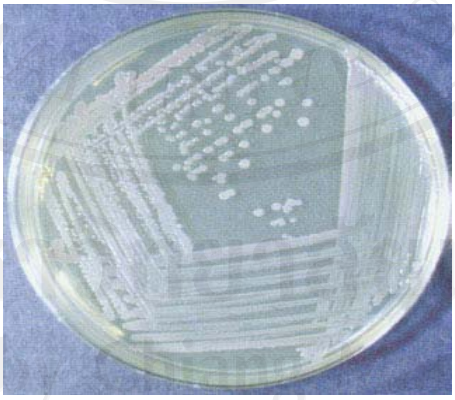
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 14 ลักษณะโคโลนีของเชื้อซัลโมเนลล่าบน XLT4 agar จะกลม นูน ใส กลางโคโลนีมีจุดสีดำ (สร้าง ไฮโดเจนซัลไฟต์ : H_2S)

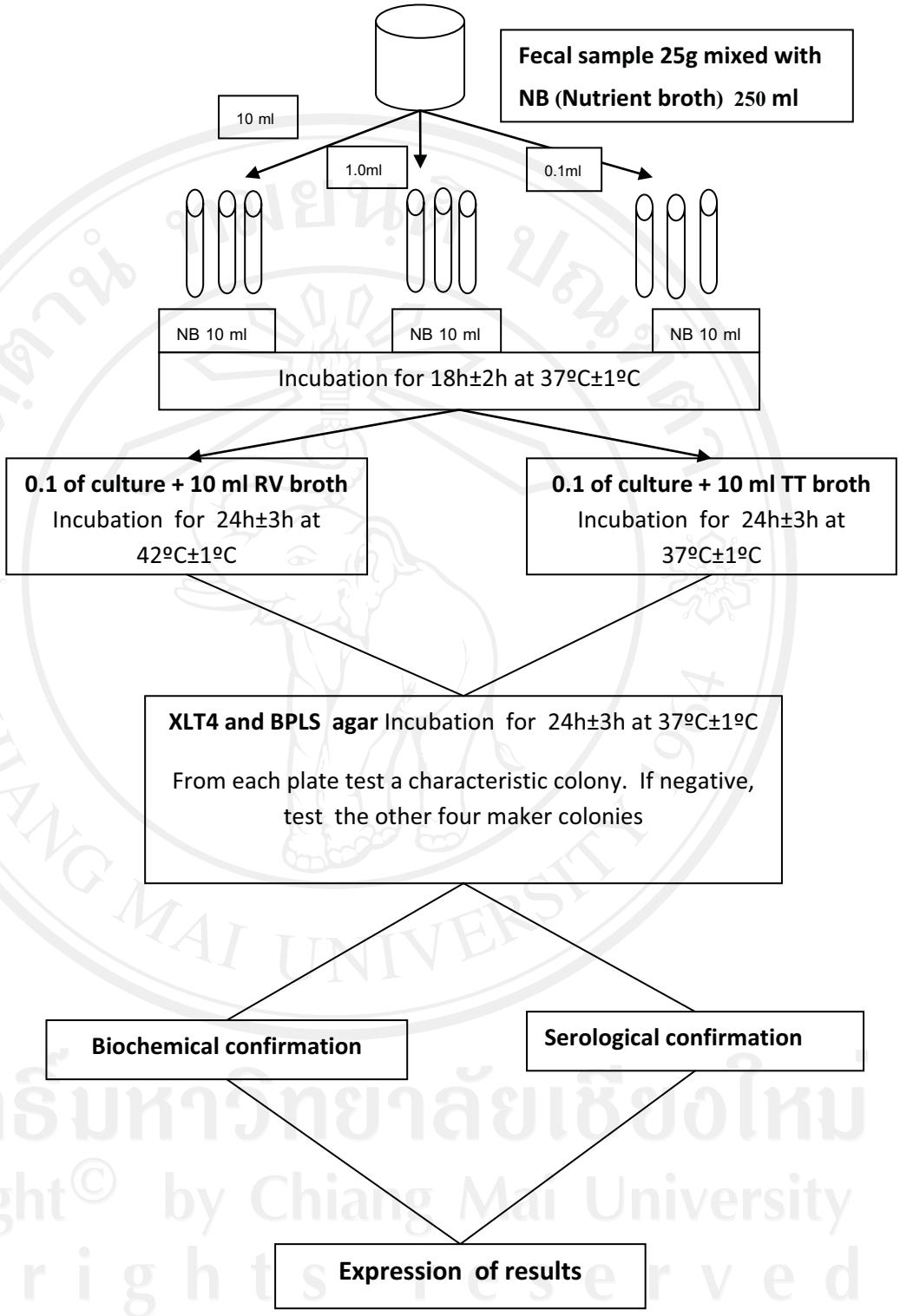


ภาพ 15 ลักษณะโคโลนีบน BPLS agar จะกลม นูนเล็กน้อย สีชมพู และสีของอาหารเลี้ยงเชื้อรอบๆ จะเปลี่ยนเป็นสีแดง หรือสีชมพู



ภาพ 16 ลักษณะโคโลนีบน NA agar กลม นูน สีขาวขุ่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 17 แสดงขั้นตอนการทำ MPN

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การทดสอบเชื้อทางชีวเคมี

3.1 การทดสอบการหาเอนไซม์ urease (Urease Test)

หลักการ : การหาเอนไซม์ urease ของเชื้อซัลโมเนลล่า เชื้อจะผลิตเอนไซม์นี้ โดยดูผลจากการย่อยยูเรีย (urea) ให้ได้แอมโมเนีย ซึ่งทำให้ pH เพิ่มขึ้น และเปลี่ยนสีอินดิเตเตอร์ คือ phenol red จากสีเหลืองเป็นสีชมพู อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คือ Urea agar ซึ่งไม่มีส่วนประกอบที่เป็นโปรตีน หรือมีโปรตีนน้อย ป้องกัน pH เพิ่มจากการ deamination ของโปรตีน เชื้อซัลโมเนลล่าให้ผลการทดสอบ เป็นผลลบ(-)

การทดสอบ : เพาะเชื้อลงบนผิววุ้น Urea agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน18 - 24 ชั่วโมง

การอ่านผล : ผลบวก : เปลี่ยนเป็นสีชมพู

ผลลบ : ไม่มีการเปลี่ยนสี

3.2 การทดสอบ การใช้น้ำตาล (TRIPLE SUGAR IRON (TSI)Agar Test)

หลักการ : ใน TSI agar มีปริมาณ น้ำตาลแลคโตส และ น้ำตาลซูโครต 10 เท่าของน้ำตาลกลูโคส แบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาพที่ไม่มีอากาศ ในกระบวนการหายใจ (respiration) จะให้กรด สังเกตได้โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีแดง-ส้มเป็นสีเหลือง เฉพาะที่ก้นหลอดมากกว่าผิวบนของอาหารเลี้ยงเชื้อ (slant) แบคทีเรียที่เจริญบนผิวของ TSI สามารถผลิตด่างจากการใช้เปปโตน โดยวิธีการ oxidative decarboxylation ทำให้เห็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่สัมผัสกับอากาศ (slant) เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส แต่ไม่สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตสและน้ำตาลซูโครส จะเห็นบนผิวหรือหน้าวุ่นเป็นสีแดง และสร้างกรด (สีเหลือง) ที่ก้นหลอด หลังจากบ่มเชื้อไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สามารถหมักย่อยน้ำตาลแลคโตส หรือน้ำซูโครส (หรือทั้งสองอย่าง) รวมทั้งน้ำตาลกลูโคส จะให้กรดปริมาณมาก แต่ถึงแม้จะเกิด oxidative deamination ซึ่งให้แอมโมเนียและมีคุณสมบัติทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นด่าง ก็ไม่เพียงพอที่จะสามารถเปลี่ยนสภาวะกรด จึงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาวะเป็นกรดจากการหมักย่อยน้ำตาลอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีแดง-ส้มเป็นสีเหลือง ดังนั้นแบคทีเรียที่ผลิตกรดทั้งบนผิววุ้น (slant) และก้นหลอด จะไม่สามารถบอกได้ว่า มีการหมักย่อยน้ำตาลแลคโตส หรือน้ำซูโครสหรือทั้งสองชนิด

สำหรับการเกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจน สังเกตได้จากรอยแตก หรือฟองอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อ ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์นั้นเกิดจากกระบวนการ รีดักชั่น (reduction) ของ thiosulfate ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์นี้ไม่มีสี ดังนั้นตรวจสอบได้โดยใช้ ferric ammonium sulfate (อินดิเคเตอร์) โดยเมื่อก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์รวมตัวกับ เฟอร์ริค อิออน (ferric ion) จะเกิดเฟอร์รัสซัลไฟด์ (ferrous sulfide) เป็นตะกอนสีดำ และกระบวนการรีดักชั่นเกิดขึ้นเฉพาะในสภาพที่เป็นกรดเท่านั้น และมักเกิดบริเวณก้นหลอด เชื้อซัลโมเนลล่าให้ผลการทดสอบเป็น K/A, Gas (+,-) H_2S(+)

การทดสอบ : เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบ โดยการขีดเชื้อบนผิวหน้าวุ้นของ TSI agar ให้ทั่วและแทง (stab) ปลายเข็มที่ขีดเชื้อลงลึกประมาณ 2 ใน 3 ของอาหารเลี้ยงเชื้อจนถึงก้นหลอดบ่มไว้ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

การอ่านผล : 1. ผลการหมักย่อยน้ำตาล ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว บนผิววุ้น (slant) ที่มีสีแดง-ส้มซึ่งเป็นสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ เปลี่ยนไปเป็นสีแดงเข้ม (alkaline หรือ K) ส่วนที่ก้นหลอด (butt) เปลี่ยนจากสีแดง-ส้มเป็นสีเหลือง (acid หรือ A) หรืออ่านผลว่า K/A แบคทีเรียหมักย่อยทั้งน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลแลคโตสหรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสร่วมกับน้ำตาลซูโครส หรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลทั้งสามชนิดได้ ทั้งบนผิว (slant) และที่ก้น (butt) ของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีแดง-ส้มเป็นสีเหลืองทั้งหลอด หรืออ่านผลว่า A/A แบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดใดๆ เลย มีอยู่ 3 แบบ คือ N/N, K/N, K/K (N: ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเชื้อ, K: เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การเกิดก๊าซ จะเห็นรอยแตก หรือสังเกตเห็นฟองอากาศ

3.การเกิดไฮโดรเจนซัลไฟด์ จะเห็นสีดำของตะกอน เฟอร์รัสซัลไฟด์อยู่ที่ก้นหลอดเป็นสีดำ บนผิววุ้น (slant) จะเห็นเป็นสีแดงซึ่งเป็นสีของโคโลนี

3.3 การทดสอบ MIL Media(Motility Indol Lysine) แบ่งเป็น 3 การทดสอบดังนี้

3.31. การทดสอบการเคลื่อนที่(Motility Test)

หลักการ : เป็นการทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อ เนื่องจากการที่เชื้อมีแฟลกเจลล่า (flagella) เชื้อที่สามารถเคลื่อนที่ได้จะสามารถเคลื่อนออกจากบริเวณเดิมไปยังบริเวณใหม่ซึ่งจะเกิดการเจริญ และแบ่งตัวต่อไป ดังนั้นถ้าต้องการทดสอบเพื่อให้เห็นลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ชัดเจนต้องเติม 2 ,3,5-triphenylteterazolium chloride (TTC) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (5 มิลลิตรต่ออาการเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร) แบคทีเรียที่เจริญทวีจำนวนจะนำ TTC ซึ่งไม่มีสีเข้าสู่เซลล์ เกิดการ reduce TTC ทำให้ตรงบริเวณที่มีการเจริญทวีจำนวนขอ ง แบคทีเรีย เชื้อซัลโมเนลล่าให้ผลการทดสอบเป็นบวก (+)

การทดสอบ : เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน Motility test medium โดยแทง (stab) ปลายเข็มที่ขีดเชื้อลงลึกประมาณ 2 ใน 3 ตรงๆ เพียงครั้งเดียว บ่มที่อุณหภูมิ 37 อาศา เซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล ถ้ายังให้ผลลบให้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องต่อไปอีก 1 -2 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงเป็นระยะ

การอ่านผล : ผลบวก : ไม่มีการเจริญที่ชัดเจนบริเวณรอย stab แต่อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหลอดขุ่นกว่าเดิม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลลบ : เห็นการเจริญของเชื้อออกนอกรอย stab อย่างชัดเจนที่บริเวณรอย stab โดยเห็นขอบเขตของเชื้อที่เจริญอย่างชัดเจน แม้บ่มเชื้อต่ออีก 2 สัปดาห์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

3.3.2. การทดสอบ Indole (Indole Test)

หลักการ : เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการผลิต indole จากทริปโตเฟน(tryptophan) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ Indole broth ประกอบด้วย tryptophan rich peptone และโซเดียมคลอไรด์ เมื่อทริปโตเฟนในเปปโตนถูกออกซิไดซ์โดยแบคทีเรีย ให้ indol, skatole และ indoleacetic acid (โดยเอนไซม์ tryptophanase) ซึ่งสามารถตรวจสอบผลที่ได้จากการตรวจสอบอัลดีไฮด์ (aldehyde) ให้ผลผลิตเป็นสีแดงในส่วนที่เป็นแอลกอฮอล์ (alcoholic layer) รีเอเจนต์ที่ใช้ในการตรวจสอบ indole คือ Kovac's reagent สำหรับจำแนกแบคทีเรียวงศ์ Enterrobacteriaceae เชื้อซัลโมเนลล่าให้ผลการทดสอบเป็นลบ (-)

การทดสอบ : เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน Indole broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 อาศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง อ่านผลโดยการหยด Kovac's reagent ลงไปบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3-5 หยด เขย่าเบาๆ สังเกตสีที่เกิดขึ้น การอ่านผล ถ้าเป็นผลบวกสีของรีเอเจนต์เปลี่ยนไปเป็นสีแดง แต่ถ้าให้ผลลบสีของรีเอเจนต์ไม่เปลี่ยนแปลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.3. การทดสอบ Lysine Iron Agar Test

หลักการ : Lysine iron agar (LIA) ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae โดยความสามารถในการดึงคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากกรดอะมิโน โดยอาศัยเอนไซม์ decarboxylase ช่วยในการทำให้กรดอะมิโนมีขนาดเล็กลง เกิดเอมีน (amine) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อินดิเคเตอร์ ที่ใช้คือ บรอมครีซอล เพอเพิล (bromcresol purple)ให้สีม่วง

1. ถ้าอยู่ในสภาพที่เป็นกรดจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองและสภาพที่เป็นด่างจะเป็นสีม่วง เมื่อนำแบคทีเรียเพาะเลี้ยงลงบน LIA แบคทีเรียมีความสามารถในการหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสสร้างกรด และเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลืองที่ก้นหลอดเท่านั้น

2. แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ lysine decarodoxylase สามารถดึงก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากอะมิโนไลซีน (lysine) เพื่อผลิตเป็นสารคาดาเวอร์รีน (cadaverine) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นด่าง เมื่อรวมกับกรดซึ่งเกิดจากการหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส(ข้อ 1) จะเปลี่ยนสภาวะเป็นกลาง ที่ก้นหลอดจึงเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นกลับมาเป็นสีม่วง เช่นเดิม

3. แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ lysine deaminase สามารถดึง amino group ออกจากไลซีนได้ ในสภาวะที่มีออกซิเจน และ amino group จะถูกเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนีย และปล่อยออกนอกเซลล์ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่สัมผัสกับอากาศ (slant) เปลี่ยนเป็นสีแดง เพราะมีสภาวะเป็นกรด สีแดงที่เกิดขึ้น(สาเหตุที่เป็นสีแดงเป็นเรื่อที่เข้าใจได้อยาก)น่าจะมาจากสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสีส้มผสมกับสีม่วงรวมกันเป็นสีแดง

4. แบคทีเรียที่สามารถให้ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เมื่อ ก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ทำปฏิกิริยากับเฟอร์ริคอิออน (ferric ion) ของสารประกอบเฟอร์ริคแอมโมเนียซิเตรต (ferric ammonium citrate) ให้ผลผลิตเป็นเฟอร์รัสซัลไฟด์ (ferrous sulfide) ซึ่งเป็นสารประกอบสีดำทั้งหลอด เชื้อซัลโมเนลล่าให้ผลการทดสอบเป็น (+/-)

การทดสอบ : เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบน LIA โดยการแทงเข็มลงในหลอดทดสอบตรงๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 อาศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล

การอ่านผล :1.สีม่วง(ผิววุ้น) + /สีเหลือง(ก้นหลอด) – : แสดงว่าบนผิววุ้น (slant)เกิดสีม่วงไม่มีการผลิตเอนไซม์ lysine decarboxylase และก้นหลอด(butt)เกิดสีเหลืองก็ไม่มีการผลิตเอนไซม์ lysine deaminase เช่นกัน

2.สีม่วง(ผิววุ้น) -/สีม่วง(ก้นหลอด) - : แสดงว่าบนผิววุ้นมีการผลิตเอนไซม์ lysine decarboxylase และก้นหลอดเกิดสีม่วงไม่มีการผลิตเอนไซม์ lysine deaminase

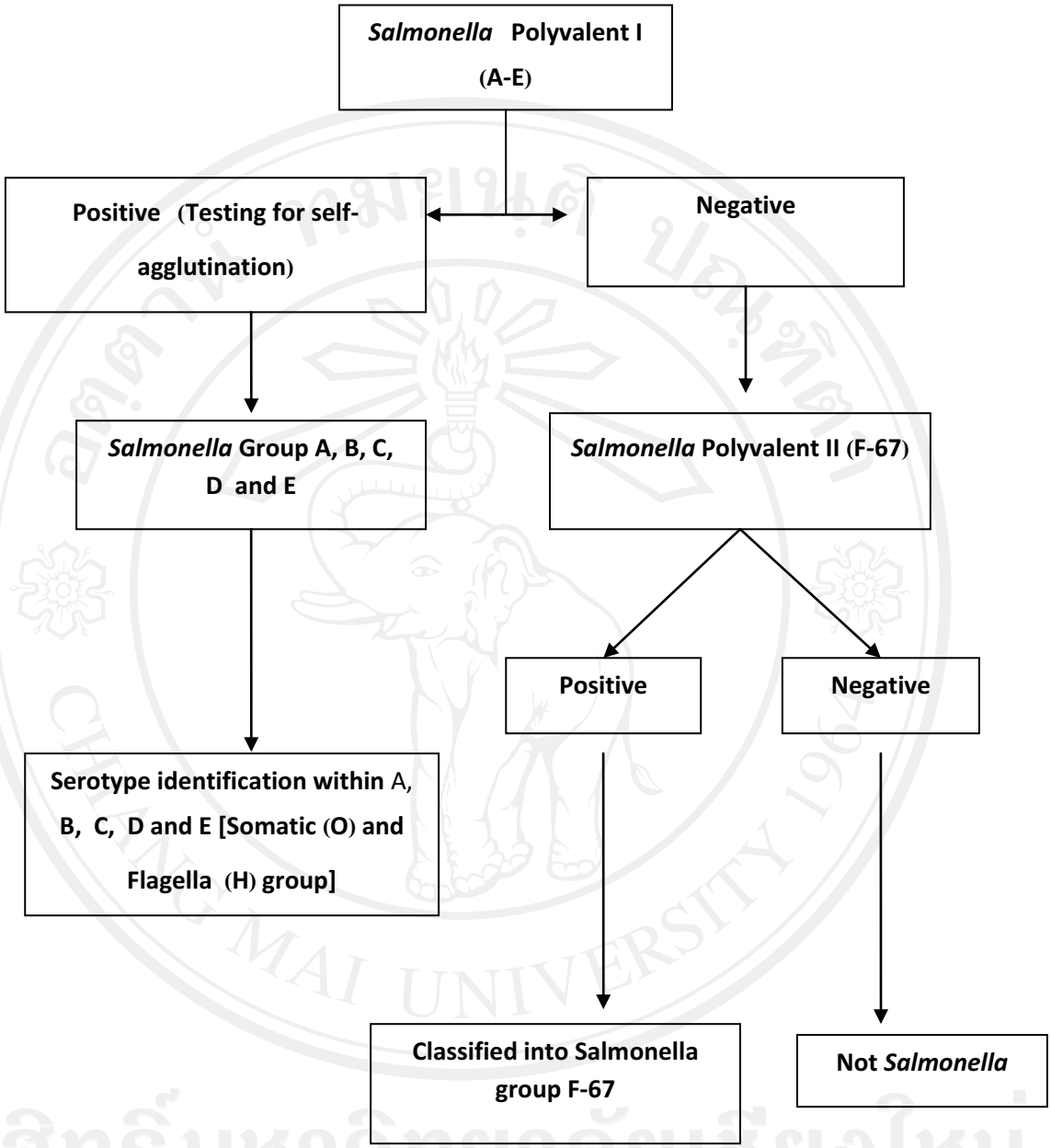
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.สีแดง(ผิววุ้น) +/สีเหลือง(ก้นหลอด) + : แสดงว่าบนผิววุ้นมีการผลิตเอนไซม์ lysine decarboxylase และก้นหลอดเกิดสีเหลืองไม่มีการผลิตเอนไซม์ lysine deaminase

4.สีดำทั้งหลอด มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

ผลที่ได้จากการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (biochemical test) เพื่อยืนยันว่าเชื้อที่ผ่านการทดสอบคือเชื้อซัลโมเนลล่า โดยอ่านผล MPN ตามตารางมาตรฐานของ AOAC international (Cuniff, 1998) โดยใช้จำนวนหลอด NB ที่ขุ่นจากข้อ 2.1 ซึ่งทดลองถึงข้อ 2.2 ยืนยันผลที่ได้เป็นเชื้อซัลโมเนลล่าจริง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 18 แสดงขั้นตอนการตรวจแยกซีโรไทป์

การทดลองที่ 2 การตรวจแยกซีโรไทป์ของเชื้อซัลโมเนลล่าและ การศึกษาความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบพลูและสารยูจีนอลมาตราฐานที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อซัลโมเนลล่า

1. ศึกษาการตรวจแยกซีโรไทป์ของเชื้อซัลโมเนลล่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตรวจแยกซีโรไทป์ของเชื้อซัลโมเนลล่าด้วยวิธี Slide agglutination test (Papoff, 1992) โดยสุ่มตัวอย่างเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการ ก่อนทดลอง 10 ตัวอย่าง และหลังทดลอง 10 ตัวอย่าง

1.1 อุปกรณ์และสารเคมี

- กระจกสไลด์ (glass slide)
- น้ำเกลือ 0.85% (0.85% Normal saline solution)
- Antiserum *Salmonella* Polyvalent F-67
- Antiserum *Salmonella* Polyvalent A-E
- Antiserum *Salmonella* Group
- loop ขนาด 3 มม.

1.2 วิธีการทดสอบ

1.2.1 หยด 0.85 % NSS ลงบน slide 1 หยด เขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว โดยเลือกโคโลนีบน NA มาละลายใน 0.85 % NSS กวนให้เข้ากัน แล้วสังเกตว่าเกิดการจับกลุ่มภายใน 30 วินาที หรือไม่หากเกิดการตกตะกอนแสดงว่าเชื้อดังกล่าวไม่สามารถทดสอบซีโรไทป์ได้เนื่องจากโคโลนีมีลักษณะไม่เรียบซึ่งจะตกตะกอนกับ 0.85 % NSS และ ตกตะกอนกับ antiserum ทุกชนิด ทำให้ไม่สามารถวินิจฉัยได้ว่าเป็นเชื้อชนิดใด ถ้าไม่ตกตะกอนใน 0.85 % NSS นำไปทดสอบต่อ

1.2.2 หยด antiserum *Salmonella* Polyvalent A-67 และ antiserum *Salmonella* Polyvalent A-E บน slide อย่างละ 1 หยดบน slide เดียวกัน และเขี่ยบน NA มาทดสอบกับ antiserum ทั้ง 2 ชนิดกวนให้เข้ากันกับ antiserum ในแต่ละชนิด เอียง slide ไปมาหลายๆ ครั้ง สังเกตปฏิกิริยาการจับกลุ่มที่เกิดขึ้นจะเห็นภายใน 30-60 วินาที ถ้าตกตะกอนต่อ antiserum ใดก็แสดงว่าเชื้อนั้นมี antigen ต่อ antiserum นั้น เนื่องจากในขั้นตอนนี้ใช้ antiserum รวมหลายชนิดจึงยังไม่สามารถบอกว่าเป็น group ใด กรณีที่ให้ผลเป็นบวก (+) ต่อ antiserum

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Salmonella Polyvalent A-E อาจเป็นชนิดใดชนิดหนึ่งระหว่าง *Salmonella* group A ถึง *Salmonella* group E แต่ให้ผลบวกต่อ antiserum *Salmonella* Polyvalent F-67 แสดงว่าเชื้อนั้นจะอยู่ระหว่างช่วง *Salmonella* group F ถึง *Salmonella* O:67

1.2.3 จากทดสอบในข้อ 1.2.2 antiserum เดียวแต่ละ group คือ *Salmonella* group A, group B, group C, group D, ถึง group E I (หรือ antiserum *Salmonella* Polyvalent A-E) ถ้าให้ผลบวก group ใด แสดงว่าเป็น *Salmonella* group นั้นเช่น ให้ผลบวกกับ antiserum *Salmonella* group B แสดงว่าเชื้อที่นำมาจาก NA นั้นเป็น *Salmonella* group B

1.2.4 เมื่อวินิจฉัยในเบื้องต้นได้แล้วว่าเป็น *Salmonella* serogroup ใด จะส่งตัวอย่างไปทดสอบยืนยันเชื้อที่ Center for Antimicrobial Resistance Monitoring in Foodborne Pathogens คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อตรวจสอบว่าเป็น serovar ใดต่อไป

2.ศึกษาประสิทธิภาพความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบจากใบพลูและสารยูจีนอลมาตรฐานที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อซัลโมเนลล่า

ศึกษาความเข้มข้นต่ำสุด (Minimal inhibitory concentration : MIC) ของสารสกัดหยาบจากใบพลูเปรียบเทียบสารยูจีนอลมาตรฐานที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อซัลโมเนลล่าจากตัวอย่างที่นำไปตรวจแยกซีโรไทป์ทั้ง 20 ตัวอย่าง ด้วยวิธี agar dilution test ตามวิธีของ Balows and Hausler (1981)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. อุปกรณ์และสารเคมี

เครื่องมือ	**ขนาด**	**บริษัท**	**ประเทศ**

1. เครื่องวัดความโปร่งแสง	-	-	-
2. Cotton swab	S	-	-
3. incubator	37°C	Memmert	Germnay
4. loop	Ø 3mm	-	-
5. pH meter	-	-	-
6. Pipette	5 ml	Jaytec	England
7. Pipette	10 ml	Jaytec	England
8. Pipette	25 ml	Jaytec	England
9. Plastics Petri dish	Ø 90 mm	Hycon	USA
11. Screw cap tube	18 x 150 mm	Pyrex	USA
12. Water bath	50 °C	-	-

ชื่อสารเคมี	**บริษัท**
1. เชื้อซัลโมเนลล่า	-
2. น้ำกลั่น	-
3. สารสกัดหยาบจากใบพลู	-
4. Ethyl alcohol 95 %	Merck
5. Mueller Hinton Agar (MHA)	Merck
6. Nutrient Agar (NA)	Merck
7. Standard Eugenol	Merck

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การสกัดสารสกัดหยาบจากใบพลู

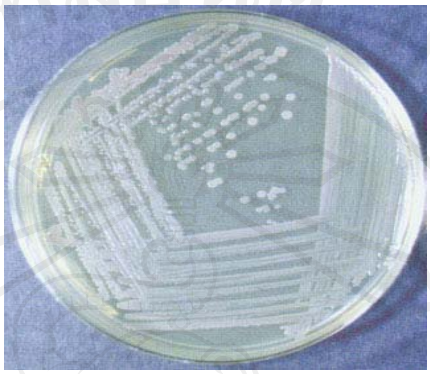
การสกัดหยาบเป็นการสกัดที่สามารถสกัดเอาสารที่มีอยู่ในใบพลูออกมาได้ทั้งหมด โดยได้สารสกัดข้นเหนียวสีน้ำตาลปนเขียว กลิ่นหอมละลายได้ดีในแอลกอฮอลล์และPolyethylene Glycol ไม่ละลายน้ำ มี pH 4.4 (พาณี, 2546) วิธีการสกัดสารสกัดหยาบจากใบพลู แสดงดังภาพ 19

ภาพ 19 ขั้นตอนการสกัดสารสกัดหยาบจากใบพลู

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. วิธีการทดสอบ Minimal inhibitory concentration (MIC)

1 นำเชื้อจาก TSI มาเพาะลงบน NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 อาศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง จะได้โคโลนีของเชื้อซัลโมเนลล่าลักษณะ กลม นูน สีขาวขุ่น (ภาพ 20)



ภาพ 20 โคโลนีของเชื้อซัลโมเนลล่าบน Nutrient agar

2. ละลายสารสกัดหยาบจากใบพูลหรือสารยูจีนอลมาตรฐาน 25 ml ใน ethyl alcohol 95 % 25 ml นำสารละลายที่ได้มาผสมกับ Mueller Hinton Agar (MHA) โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นจนถึงสุดท้ายของสารสกัดหยาบหรือสารยูจีนอลมาตราฐาน มีค่าเท่ากับ 6.25 , 3.125, 1.5625, 0.7812 , 0.3906 , 0.1953 , 0.0976 , 0.0488 , 0.0244 , 0.0122 และ 0.0061 µl/MHA 1 ml เทส่วนผสมหนา 5 มม. ต่อเพลท(ภาพ 21)

ภาพ 21 การเตรียมสารสกัดหยาบหรือสารยูจีนอลมาตาฐานที่ความเข้มข้นที่ระดับต่างๆ ผสมกับ MHA

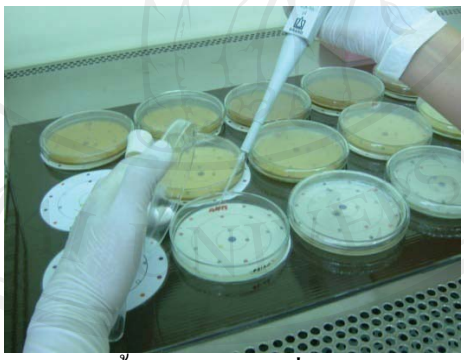
3. ใช้ cotton swab เบอร์ s ที่ทำการฆ่าเชื้อและปราศจากสารเคมีแตะโคโลนีของเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(ภาพ 22) มาละลายในน้ำกลั่น pH 7.2-7.4 ปรับความข้นให้เท่ากับ 0.5 McFarland (มีเชื้อประมาณ 10^8 colony-forming unit)โดยใช้เครื่องวัดความโปร่งแสง (ภาพ 23) จากนั้นหยดเชื้อซัลโมเนลล่าที่เตรียมไว้ข้างต้นลงบน MHA ที่ผสมสารสกัดหยาบ หรือสารยูจีนอลมาตรฐาน(ภาพ 24) (แต่ละตัวอย่างทำ 2 ซ้ำ) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง นำมาตรวจการเจริญของเชื้อ บน MHA ที่ความเข้มข้นในระดับต่างๆ โดยเพลทที่ไม่มีการเจริญของเชื้อที่ความเข้มข้นแรกเป็นค่า MIC ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ

ภาพ 22 ใช้ cotton swab เบอร์ s แตะโคโลนีของเชื้อมาละลายในน้ำกลั่น

ภาพ 23 การใช้เครื่องวัดความโปร่งแสงปรับความข้นให้เท่ากับ 0.5 McFarland



ภาพ 24 หยดเชื้อซัลโมเนลล่าที่เตรียมลงบน MHA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Varience) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว ตามวิธี Duncan's new Multiple range test และเปรียบเทียบอัตราการเกิดท้องร่วงของลูกสุกรกลุ่มต่าง ๆ รวมถึงเปรียบเทียบความแตกต่าง

ของปริมาณเชื้อซัลโมเนลล่าในแต่ละกลุ่มและเปรียบเทียบปริมาณเชื้อก่อนและหลังการทดลองของแต่ละกลุ่ม ด้วยวิธี X^2 test โดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 11.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved