บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของสารสกัดหยาบของใบฝรั่งและใบคูน การทดลองที่ 2 ศึกษาผลการเสริมใบฝรั่งและใบคูนในรูปผงและสารสกัดต่อสมรรถภาพการผลิตและความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ในสุกรหย่านม

1) การทดลองที่ 1 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ของสารสกัดหยาบของใบฝรั่งและใบคูน

1.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1.1 พืชสมุนไพร

1. ใบฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn. leaf) รวบรวมจากเขตพื้นที่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่
2. ใบคูน (*Cassia fistula* Linn. leaf) รวบรวมจากเขตพื้นที่ อ. แม่วาง จ. เชียงใหม่

1.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

EMB (Eosin methylene - blue) agar, Himedia

NA (Nutrient agar), Merck

MHB (Muller hinton - broth), Becton

1.1.3 เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

เชื้อ *Escherichia coli* ที่แยกได้จากตัวอย่างอุจจาระของสุกรหย่านม จากคอกสัตว์ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.4 อุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
2. หลอดทดลอง (test tube) พร้อมฝาปิด ขนาด 13 x 100 และ 16 x 150 มิลลิเมตร

3. ที่ตั้งหลอดทดลอง (test tube rack)
4. เข็มเขี่ยเชื้อ (loop)
5. ช้อนตักสาร
6. ออโตปิเปต (autumetric pipette) ขนาด 100 - 1,000 ไมโครลิตร
7. ทิป (pipette tip) ขนาด 1,000 ไมโครลิตร
8. กระบอกตวง (graduated cylinder) ขนาด 500 และ 50 มิลลิลิตร
9. บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 250, 500, 1,000 และ 3,000 มิลลิลิตร
10. ขวด duran ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
11. ขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
12. ขวดรูปชมพู่แบบมีฝาปิด (flask screw cap) ขนาด 250 มิลลิลิตร
13. กรวยกรอง (glass funnel) ขนาด 12 เซนติเมตร
14. เตาไฟฟ้า (hot plate)
16. กระดาษกรอง เบอร์ 1
17. โกร่งบดยา
18. สำลี

1.1.5 เครื่องมือ

1. หม้อนึ่งไอน้ำ (autoclave)
2. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)
3. ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator)
4. เครื่องระเหยความชื้น (rotary evaporator)
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
6. เครื่อง spectrophotometer
7. เครื่องเขย่า (vortex)
8. เครื่องชั่งสาร (balance) ทศนิยม 2 ตำแหน่ง
9. เครื่องดูดอากาศ (pump)
10. desiccators vacuum
11. เครื่องบดละเอียด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.6 สารเคมี

1. น้ำกลั่น (distilled water)
2. 100 % เฮกเซน (hexane)
3. 95 % เอธานอล (ethanol)
4. 100 % เมทานอล (methanol)
5. DI (deionized water)
6. 0.85 % NaCl (normal saline solution)
7. DMSO (dimethylsulphoxide), Antibiocos

1.2 วิธีการทดลอง

นำใบฝรั่งและใบคูนมาล้างน้ำให้สะอาด ตัดขั้วใบออก แล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมาบดจนได้ผงใบฝรั่งและใบคูน นำผงใบฝรั่งและใบคูนที่ได้มาสกัดด้วยวิธีการหมัก (maceration) ด้วยตัวทำละลายต่างๆกัน คือ น้ำกลั่น, เอธานอล (95 %), เมทานอล (100 %) และเฮกเซน (100 %) แล้วนำสารสกัดใบฝรั่งและใบคูนที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดมาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* (Minimum Inhibition Concentration : MIC) จากอุจจาระสุกรหย่านม จากคอกสัตว์ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยวิธี broth dilution และทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดสมุนไพรในการทำลายเชื้อ *E. coli* (Minimum Bactericidal Concentration : MBC) โดยการนำสารละลายจากการหา MIC ดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงเชื้อต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ ห้องปฏิบัติการคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อทราบถึงค่าความสามารถในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อ *E. coli* ในอุจจาระสุกรหย่านมของสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งและใบคูน

1.2.1 การสกัดใบฝรั่งและใบคูน

- นำใบฝรั่งและใบคูนสดมาล้างด้วยน้ำสะอาด เพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ปนเปื้อนออก ตัดขั้วใบออก แล้วนำไปผึ่งลมให้แห้ง
- นำไปอบด้วยตู้อบฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 2 วัน
- นำใบฝรั่งและใบคูนที่แห้งแล้วไปบดด้วยเครื่องบดละเอียด นำผงสมุนไพรที่ได้ไปชั่งน้ำหนักและบันทึกไว้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- นำผงใบฝรั่งและใบคูนมาแยกใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 3,000 มิลลิลิตร ใส่ตัวทำละลายที่ใช้สกัดจนท่วมผงสมุนไพร ในอัตราส่วนผงสมุนไพร 250 กรัมต่อตัวทำละลาย 1 ลิตร จากนั้นปิดบีกเกอร์ให้สนิทแล้วหมักโดยแช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน โดยหมั่นคนตลอดเวลาเพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด

- กรองด้วยผ้าขาวบางหรือผ้ากร๊อสเพื่อแยกกากออก แล้วกรองซ้ำอีกครั้งด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 1

- นำสารละลายที่ได้ไประเหยแห้งเพื่อแยกตัวทำละลายออก ด้วยเครื่องระเหยความชื้น (rotary evaporator) จนได้สารข้นเหนียว

- นำสารสกัดที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 1 วัน เพื่อให้สารสกัดเข้มข้นมากขึ้น แล้วบันทึกน้ำหนักสารสกัดที่ได้

- นำสารสกัดที่มีลักษณะเป็นของเหลวและครีมบรรจุในขวดป้องกันแสง ส่วนสารสกัดที่มีลักษณะเป็นของแข็งจะถูกนำไปบดละเอียดด้วยโกร่งบดยา แล้วเก็บใส่ซองพลาสติก จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 15 °C จนกว่าจะนำมาใช้ทำการทดลอง

ภาพที่ 10 การเจริญของเชื้อ *E. coli* บน EMB agar

ภาพที่ 11 การเจริญของเชื้อ *E. coli* บน NA

1.2.2 การหาค่า MIC และ MBC ของสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งและใบคูน

- การเตรียมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรีย

เชื้อ *E. coli* ได้จากการเก็บตัวอย่างอุจจาระของลูกสุกรหย่านมในคอกสัตว์ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ นำไปแยกเชื้อโดยใช้ loop แตะตัวอย่างอุจจาระมาป้ายบน Eosin methylene - blue (EMB) agar แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญบน EMB agar มีลักษณะเป็นจุดดำตรงกลางเคลือบด้วยสีเขียวเป็นมันวาวคล้ายโลหะ ผิวเรียบนูนเล็กน้อย (ภาพที่ 10) จากนั้นนำมาแยกเชื้อให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

บริสุทธิ์อีกครั้งโดยใช้ loop แตะเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวๆมาป้ายบน EMB agar แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นติดขอบจานเพาะเชื้อด้วยแผ่นพาราฟิน แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 °C จนกว่าจะใช้ในการทดลอง

เตรียมการทดสอบหาค่า MIC โดยการนำเชื้อ *E. coli* ที่เก็บรักษาไว้มา subculture บน Nutrient agar (NA) แล้วนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญบน NA มีลักษณะเป็นสีเทา ผิวเรียบชื้นเป็นมัน (ภาพที่ 11) จากนั้นใช้ loop แตะเชื้อ *E. coli* ไปละลายใน 0.85 % normal saline solution (NaCl) ที่ปราศจากเชื้อในหลอดทดลองมีฝาปิดขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร เขย่าสารละลายให้เข้ากันด้วย vortex แล้วแบ่งสารละลายมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ค่าความยาวคลื่นเท่ากับ 625 นาโนเมตร โดยเจือจางสารละลายจนกระทั่งมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 ซึ่งจะมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 10^8 CFU / มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายด้วย Muller hinton - broth (MHB) ให้มีความเข้มข้นของเชื้อเป็น 10^6 CFU / มิลลิลิตร (สาธร และคณะ, 2544) ซึ่งจะเทียบเท่ากับค่าความขุ่นของ McFarland No 0.5 (McFarland No 0.5 เตรียมโดยผสม 0.5 มิลลิลิตรของ 1.175 % $BaCl_2$ กับ 99.5 มิลลิลิตรของ 1 % sulfuric acid) (อดิเทพ, 2547) โดยการปิเปตสารละลายที่ได้ไปละลายใน MHB ที่อัตราส่วน 1 : 100 ในภาชนะปิดที่ปราศจากเชื้อ เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบหาค่า MIC ของสมุนไพรต่อไป

- การเตรียมตัวอย่างสารละลายสมุนไพร

ชั่งสารสกัดใบฝรั่งและใบคูนที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำกลั่น, เอธานอล, เมทานอล และเฮกเซน ใส่ในหลอดทดลองมีฝาปิดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ตัวอย่างละ 1 หลอด หลอดละ 1.5 กรัม จากนั้นเติม 1 % dimethylsulphoxide (DMSO) ซึ่งได้จากการละลาย DMSO ลงใน deionized water (DI) ที่อัตราส่วน 1 : 100 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด (ภาพที่ 12) เขย่าสารละลายสมุนไพรให้เข้ากันด้วย vortex เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบหาค่า MIC ต่อไป

- การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

- เตรียม EMB agar และ NA บรรจุในภาชนะปิด หลังจาก sterile ด้วย autuclave แล้ว นำออกมาเทใส่จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นและแข็งตัว แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 °C จนกว่าจะใช้ในการทดลอง

- เตรียม MHB บรรจุในภาชนะปิด หลังจาก sterile ด้วย autoclave แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 15 °C จนกว่าจะใช้ในการทดลอง (ภาพที่ 13)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 12 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรในการทดลองหาค่า MIC

ภาพที่ 13 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบหาค่า MIC

- การทดสอบหาค่า MIC โดยวิธี broth macrodilution

เตรียมหลอดทดลองมีฝาปิด ขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร เขียนหมายเลขกำกับโดยแบ่งออกเป็น 8 ตัวอย่าง ได้แก่ สารสกัดใบฝรั่งที่สกัดด้วยน้ำกลั่น, เอธานอล, เมทานอล, เฮกเซน และสารสกัดใบคูนที่สกัดด้วยน้ำกลั่น, เอธานอล, เมทานอล และเฮกเซน ในแต่ละตัวอย่างแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 10 หลอด คือ กลุ่มทดลอง, กลุ่ม duplicate (กลุ่มทดสอบซ้ำเช่นเดียวกับกลุ่มทดลอง) และกลุ่ม negative control (กลุ่มที่ปราศจากเชื้อ) นอกจากนี้ยังทำกลุ่ม positive control (กลุ่มที่ปราศจากสารสกัดสมุนไพร) แยกต่างหากอีก 1 กลุ่ม 2 หลอดด้วย จากนั้นทดสอบการหาค่า MIC ด้วยการเจือจางแบบ 2 - fold dilution (เจือจางครั้งละ 2 เท่า) ดังตารางที่ 2 โดย

- ปิเปต MHB ที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดทดลองที่ 2 - 10 ของกลุ่มทดลอง, กลุ่ม duplicate และกลุ่ม negative control หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

- ปิเปตสารละลายสมุนไพรที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดทดลองที่ 1 และ 2 ของกลุ่มทดลอง, กลุ่ม duplicate และกลุ่ม negative control หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

- ใช้ auto pipette ผสมสารละลาย (MHB และสารละลายสมุนไพร) ในหลอดทดลองที่ 2 ให้เข้ากัน โดยใช้ปิเปตดูดขึ้นและปล่อยลงหลายๆครั้ง แล้วปิเปตสารละลายนั้น 0.5 มิลลิลิตร ไปใส่ในหลอดทดลองที่ 3 จากนั้นผสมแล้วปิเปตสารละลายในหลอดทดลองที่ 3 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ไปใส่ในหลอดทดลองที่ 4 ทำซ้ำเช่นนี้ต่อไปจนถึงหลอดทดลองที่ 10 ซึ่งผสมแล้วปิเปตสารละลายทิ้งไป 0.5 มิลลิลิตร โดยทำดังนี้กับทั้งกลุ่มทดลอง, กลุ่ม duplicate และกลุ่ม negative control

- นำสารละลายเชื้อ *E. coli* ที่เตรียมไว้ใส่ในหลอดทดลองที่ 1 - 10 ของกลุ่มทดลอง และกลุ่ม duplicate หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากันด้วย vortex

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ใส่ MHB ในหลอดทดลองที่ 1 - 10 ของ กลุ่ม negative control หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากันด้วย vortex

- ปิเปต 1 % dimethylsulphoxide (DMSO) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และสารละลายเชื้อ *E. coli* ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองของกลุ่ม positive control ทั้ง 2 หลอด แล้วเขย่าสารละลายให้เข้ากันด้วย vortex

- นำสารละลายทั้งหมดไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง แล้วสังเกตผลการทดสอบ

ตารางที่ 2 การทดสอบหาค่า MIC โดยวิธี broth macrodilution

Tube No.	Medium added (ml.)	Herb solution added	Diluted culture added (ml.)	Final vol. (ml.)	Final herb conc. (mg./ml.)
1	-	0.5 ml. working sol.	0.5	1	250.00
2	0.5	0.5 ml. working sol.	0.5	1	125.00
3	0.5	0.5 ml. from tube No. 2	0.5	1	62.50
4	0.5	0.5 ml. from tube No. 3	0.5	1	31.25
5	0.5	0.5 ml. from tube No. 4	0.5	1	15.63
6	0.5	0.5 ml. from tube No. 5	0.5	1	7.81
7	0.5	0.5 ml. from tube No. 6	0.5	1	3.91
8	0.5	0.5 ml. from tube No. 7	0.5	1	1.95
9	0.5	0.5 ml. from tube No. 8	0.5	1	0.98
10	0.5	0.5 ml. from tube No. 9	0.5	1	0.49

- pipette solution 0.5 ml. in tube No. 10 leave after added herb solution from tube No. 9.

- การอ่านค่า MIC

เปรียบเทียบความขุ่นของสารละลายใน กลุ่มทดลอง และกลุ่ม duplicate ด้วยสารละลายกลุ่ม negative control หากสารละลายของกลุ่มทดลอง และกลุ่ม duplicate ขุ่นกว่าสารละลายกลุ่ม negative control ซึ่งมีลักษณะใส แสดงถึงการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในสารละลายนั้น ซึ่งแสดงว่าสารสกัดสมุนไพรในหลอดทดลองนั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ โดยถือว่าค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรหลอดสุดท้ายที่ใส เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สารสกัดสมุนไพรนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ (MIC)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สังเกตความขุ่นของสารละลายกลุ่ม positive control หากสารละลายขุ่นแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโต แต่หากสารละลายใสแสดงว่าตัวทำละลายที่ใช้กับสารสกัดสมุนไพร มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งมีผลทำให้การอ่านผล MIC คลาดเคลื่อน จำเป็นต้องเปลี่ยนเป็นตัวทำละลายอื่นซึ่งไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

- **การทดสอบหาค่า MBC**

ใช้ loop จุ่มสารละลายจากหลอดทดลองใน กลุ่มทดลอง และกลุ่ม positive control ที่ใช้ในการทดสอบหาค่า MIC มาป้ายบน EMB agar ในจานเพาะเชื้อ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลองและกลุ่ม duplicate จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง แล้วสังเกตผลการทดสอบ

- **การอ่านค่า MBC**

สังเกตการเจริญของเชื้อแบคทีเรียบน EMB agar โดยถือว่าตัวอย่างที่มีค่าความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรต่ำสุด ซึ่งพบว่าไม่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นค่า MBC

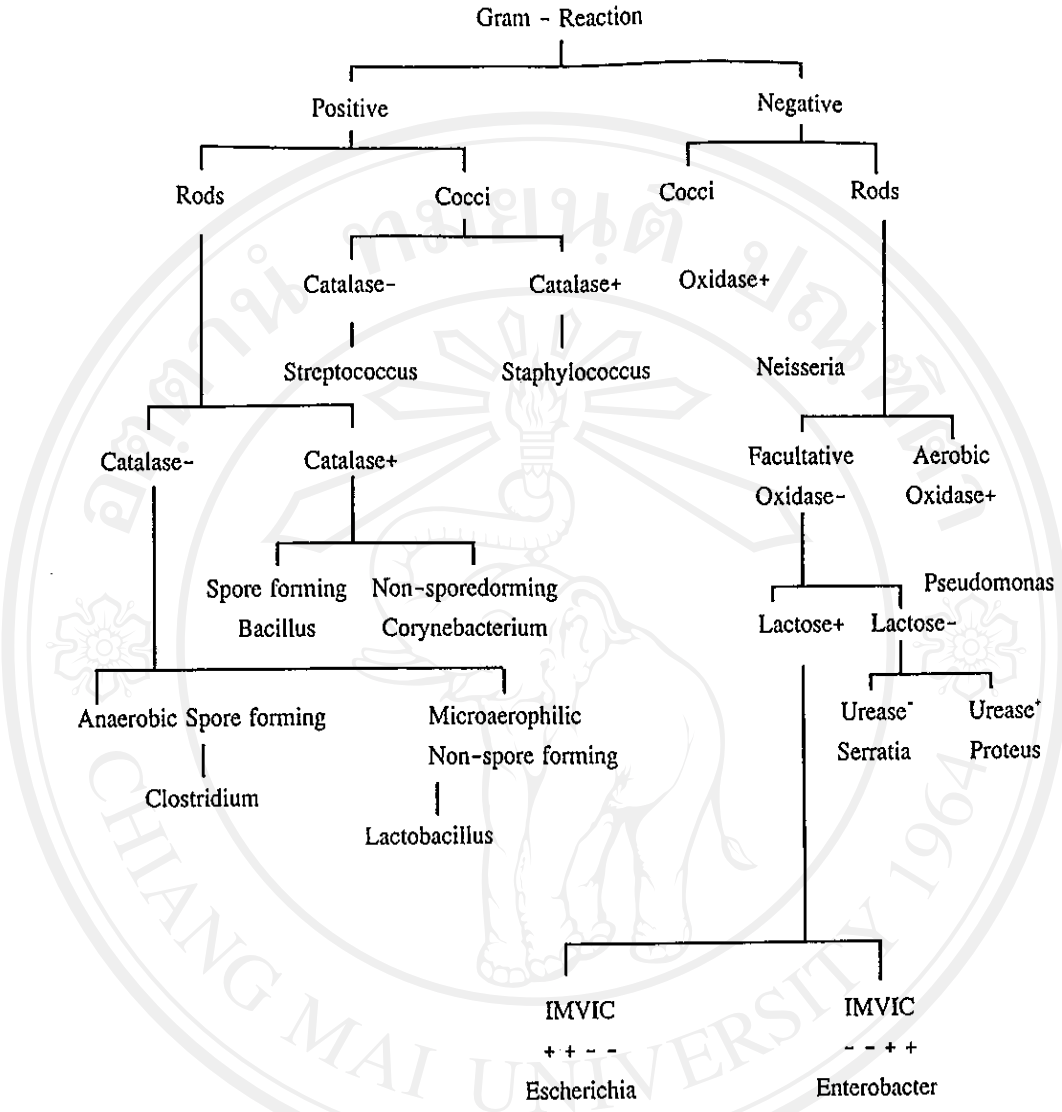
1.2.3 การจำแนกเชื้อแบคทีเรีย (identification of bacteria)

ทำการทดสอบเชื้อ *E. coli* ซึ่งได้จากการ subculture เชื้อที่ใช้ในการทดสอบหาค่า MIC เป็นการทดสอบลักษณะเฉพาะของเชื้อเพื่อยืนยันคุณสมบัติของเชื้อ *E. coli* โดยสังเกตคุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) เช่น รูปร่าง การเรียงตัวของเซลล์ และการติดสีแกรม จากการตรวจสอบการติดสีแกรม และทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี (biochemical test) ด้วยวิธีต่างๆ ครั้งละ 2 ตัวอย่าง ตามวิธีของ ดวงพร (2537); นันทนา (2537) โดยมีลักษณะเฉพาะของปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ดังแสดงไว้ในภาพที่ 14

- **การตรวจสอบการติดสีแกรม**

ใช้ loop เขี่ยเชื้อจากจานเพาะเชื้อมา smear ลงบนแผ่นสไลด์ จากนั้น fix เชื้อโดยการนำแผ่นสไลด์ที่ smear เชื้อแล้วไปผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2 - 3 ครั้ง หยดสีคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) ทิ้งไว้ 1 นาที เมื่อครบเวลา เทสีทิ้ง จากนั้นหยดลูกอลไอโอดีน (lugol's iodine) ทิ้งไว้ 1 นาที และหยดเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % นาน 30 วินาที ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงย้อมด้วยสีซาฟรานิน (safranin) เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง แล้วนำไปตรวจสอบลักษณะเซลล์และการจัดเรียงตัวด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



IMVIC หมายถึง ผลการทดสอบทางชีวเคมี 4 อย่าง คือ

I หมายถึง การทดสอบ Indole

M หมายถึง การทดสอบ MR

V หมายถึง การทดสอบ VP

IC หมายถึง การทดสอบการใช้ซิเตรท

ภาพที่ 14 ลักษณะเฉพาะของปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ

ที่มา : ดวงพร (2537)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การอ่านผล : แบคทีเรียแกรมลบ ติดสีแดง
แบคทีเรียแกรมบวก ติดสีม่วง

- การทดสอบ Catalase test

หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ลงบนสไลด์ 1 หยด จากนั้นใช้ loop เขี่ยเชื้อลงไปทำการผสมให้เข้ากัน แล้วสังเกตผล

การอ่านผล : ผลบวก มีฟองแก๊สเกิดขึ้น
ผลลบ ไม่เกิดฟองแก๊ส

- การทดสอบ Triple sugar iron (TSI) agar

เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบ โดยการใช้ loop ขีดเชื้อบนหน้าวุ้นของ TSI agar ให้ทั่ว และแทง (stab) ปลาย loop ที่ขีดเชื้อในตอนแรกลงลึกประมาณ 2 ใน 3 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล

การอ่านผล : 1) ผลการหมักย่อยน้ำตาลต่างๆ

1.1) ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสอย่างเดียว บนผิววุ้น (slant) ที่มีสีแดง - ส้มซึ่งเป็นสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะเปลี่ยนไปเป็นสีแดงเข้ม (alkaline หรือ K) ส่วนที่ก้นหลอด (butt) จะเปลี่ยนจากสีแดง - ส้มไปเป็นสีเหลือง (acid หรือ A) หรืออ่านผลว่า K / A

1.2) ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักย่อยทั้งน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตส หรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสร่วมกับน้ำตาลซูโครส หรือสามารถหมักย่อยน้ำตาลทั้งสามชนิด ทั้งบนผิว (slant) และที่ก้น (butt) ของหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีแดง - ส้มไปเป็นสีเหลืองทั้งหลอด หรืออ่านผลว่า A / A

1.3) หากแบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดใดๆเลย มีอยู่ 3 แบบ คือ N / N, K / N, K / K (N : ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ, K : เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม)

2) การเกิดแก๊ส จะเห็นเป็นรอยแตก หรือสังเกตเห็นเป็นฟองแก๊ส

3) การเกิดแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์ จะเห็นเป็นสีดำของตะกอนเฟอร์รัสซัลไฟด์อยู่ที่ก้นหลอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- การทดสอบ Methyl red - Vogesproskauer test (MR - VP test)

เพาะเชื้อลงใน MR - VP broth 2 หลอด ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อหลอดละ 1 มิลลิลิตร และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 - 3 วัน เพื่อให้แน่ใจว่าน้ำตาลกลูโคสถูกเมตาโบไลท์ (metabolite)

MR - test หยด Methyl red reagent 5 หยด ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญอยู่ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้น

VP - test ใส่ reagent ตัวแรก (alpha - naphthol) ลงไป 0.6 มิลลิลิตร เขย่าหลอด แล้วใส่ reagent ตัวที่สอง (KOH) 0.2 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ วางทิ้งไว้ 15 นาที แล้วสังเกตผล

การอ่านผล : 1) MR - test

ผลบวก เปลี่ยนเป็นสีแดง

ผลลบ เปลี่ยนเป็นสีเหลือง

2) VP - test

ผลบวก เกิดสีแดงให้เห็นภายใน 15 - 45 นาที

ผลลบ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง

- การทดสอบ Citrate utilization test

เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Citrate agar หรือ Simmons บ่มไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล

การอ่านผล : ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

ผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญไม่เปลี่ยนสี สีคงเดิม

- การทดสอบ Urease test

เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบน Urea agar slant บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล

การอ่านผล : ผลบวก อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญเปลี่ยนเป็นสีชมพู

ผลลบ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อเจริญไม่มีการเปลี่ยนสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- การทดสอบ MIL media

บ่มเพาะเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงบน MIL media โดยการแทงปลาย loop ลงในหลอดตรงๆ (stab) ลึกประมาณ 2 ใน 3 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผล

การอ่านผล : 1) การทดสอบ Motility test

ผลบวก เชื้อจะเจริญออกมานอกรอย stab หรือไม่มีรอยการเจริญที่ชัดเจนบริเวณรอยที่ทำการ stab แต่อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหลอดขุ่นกว่าเดิม

ผลลบ พบการเจริญของเชื้ออย่างชัดเจนที่บริเวณรอย stab โดยเห็นขอบเขตของเชื้อที่เจริญอย่างชัดเจน แม้จะบ่มต่อไปอีก 2 สัปดาห์ก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

2) การทดสอบ Indole test

อ่านผลโดยการหยด Kovac's reagent ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 หยด เขย่าเบาๆ แล้วสังเกตสีที่เกิดขึ้น

ผลบวก สีของ reagent เปลี่ยนเป็นสีแดง

ผลลบ สีของ reagent ไม่เปลี่ยนแปลง

3) การทดสอบ Lysine iron agar (LIA)

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

3.2) สีม่วง (slant) / สีม่วง (butt) : มีการผลิตเอนไซม์ lysine decarboxylase แต่ไม่มีการผลิตเอนไซม์ lysine deaminase

3.3) สีเหลือง (slant) / สีม่วง (butt) : มีการผลิตเอนไซม์ lysine deaminase แต่ไม่มีการผลิตเอนไซม์ lysine decarboxylase

3.4) สีดำทั้งหลอด : มีการผลิตให้แก๊สไฮโดรเจนซัลไฟด์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2) การทดลองที่ 2 ศึกษาผลการเสริมใบฝรั่งและใบคูนในรูปผงและสารสกัดต่อสมรรถภาพการผลิตและความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ในสุกรหย่านม

2.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 สัตว์ทดลอง

ลูกสุกรหย่านมลูกผสม 3 สายพันธุ์ (ลาร์จไวท์ x แลนด์เรซ x ดูรอค) มีน้ำหนักเริ่มต้นประมาณ 5.6 ± 0.8 กิโลกรัม จากคอกสัตว์ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.1.2 โรงเรือนทดลอง

คอกสัตว์ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งมีลักษณะเป็นโรงเรือนโปร่ง ประกอบด้วยกรงเหล็กยกพื้น ตั้งอยู่บนพื้นคอนกรีต หลังคากระเบื้อง มีรางอาหารโลหะพร้อมจุ๊บน้ำให้สุกรสามารถกินน้ำได้ตลอดเวลา มีทางเดินกลางโรงเรือนเพื่อให้อาหารและทำความสะอาดตลอดแนวของโรงเรือน

2.1.3 อาหารทดลอง

สุกรทุกตัวได้รับอาหารทดลองที่มีโภชนะเท่ากัน โดยสุกรในกลุ่มที่ 1 - 5 ได้รับอาหารฐานที่ทำการผสมขึ้นเอง ตามสูตรอาหารในตารางที่ 3 และสุกรในกลุ่มที่ 6 ได้รับอาหารสำเร็จรูปชนิดอัดเม็ด (เบทาโกร®)

2.1.4 สมุนไพรทดลอง

ผงใบฝรั่งและผงใบคูน ซึ่งได้มาจากการนำใบฝรั่งที่รวบรวมมาจากเขตพื้นที่ อ. เมือง และใบคูนจากเขตพื้นที่ อ. แม่วาง จ. เชียงใหม่ มาล้างน้ำให้สะอาด ตัดขั้วใบออก แล้วนำไปผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำมาบดด้วยเครื่องบดละเอียด

สารสกัดหยาบจากใบฝรั่งและสารสกัดหยาบจากใบคูน ซึ่งได้มาจากการนำผงใบฝรั่งและผงใบคูนไปสกัดด้วยวิธีการหมัก (maceration) ด้วยเอธานอล (95 %) ตามวิธีการสกัดในข้อ 1.2.1

2.1.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงสุกร

1. ถังผสมอาหาร
2. ถังเก็บอาหาร
3. ที่ตักอาหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. กระบอกฉีดยา
5. เครื่องชั่งอาหารสุกร ขนาด 1 กิโลกรัม
6. เครื่องชั่งน้ำหนักสุกร ขนาด 60 กิโลกรัม

2.1.6 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเก็บมูลสุกร

1. แอลกอฮอล์ใช้ฆ่าเชื้อปากทวารสุกร
2. ถุงมือปราศจากเชื้อ
3. ถุงพลาสติก
4. กระติกใส่น้ำแข็ง

2.1.7 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1. EMB (Eosin methylene - blue) agar, Himedia
2. 95 % เอธานอล (ethanol)
3. DI (deionized water)
4. 0.85 % NaCl (normal saline solution)
5. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
6. ตู้อบเพาะเชื้อ (incubator)
7. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
8. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)
9. เตาไฟฟ้า (hot plate)
10. เครื่องชั่งสาร (balance) ทศนิยม 1 ตำแหน่ง
11. หม้อนึ่งไอน้ำ (autoclave)
12. ที่ตั้งหลอดทดลอง (test tube rack)
13. หลอดทดลอง (test tube) พร้อมฝาปิด ขนาด 16 x 100 และ 16 x 150 มิลลิเมตร
14. ออโตปิเปต (autumetric pipette) ขนาด 100 - 1,000 ไมโครลิตร และ 10 มิลลิลิตร
15. ทิป (pipette tip) ขนาด 1,000 ไมโครลิตร
16. เข็มเขี่ยเชื้อ (loop)
17. ช้อนตักสาร
18. กระบอกตวง (graduated cylinder) ขนาด 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
19. ขวด duran ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) โดยใช้ลูกสุกรหย่านมที่อายุ 21 วัน จากคอกสัตว์ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ จำนวน 50 ตัว แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม คละเพศ โดยเริ่มทำการทดลองตั้งแต่ช่วงอายุ 21 วัน จนถึงอายุ 54 วัน รวมเป็นระยะเวลาทั้งหมดประมาณ 5 สัปดาห์ โดยแบ่งกลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ให้อาหารฐานเพียงอย่างเดียว (กลุ่มควบคุม) (n = 6)

กลุ่มที่ 2 ให้อาหารฐานผสมใบฝรั่งป่น (n = 12)

กลุ่มที่ 3 ให้อาหารฐานผสมสารสกัดหยาบจากใบฝรั่ง (n = 6)

กลุ่มที่ 4 ให้อาหารฐานผสมใบคูนป่น (n = 12)

กลุ่มที่ 5 ให้อาหารฐานผสมสารสกัดหยาบจากใบคูน (n = 8)

กลุ่มที่ 6 ให้อาหารสำเร็จรูปชนิดอัดเม็ดที่ใช้ในฟาร์ม (n = 6)

โดยอาหารกลุ่มที่ 2 - 5 จะเสริมสมุนไพรในอัตราส่วนเป็น 10 เท่าของค่า MIC ต่อน้ำหนักตัวของลูกสุกร 1 กิโลกรัมต่อวัน สมุนไพรในกลุ่มที่ 3 และ 5 สกัดด้วยเอธานอล (95 %) และให้อาหารสุกรวันละ 2 ครั้ง เช้า - เย็น โดยสุกรในแต่ละกลุ่มการทดลองได้รับอาหารและน้ำดื่มอย่างเต็มที่ อาหารฐานในกลุ่มที่ 1 - 5 เป็นอาหารสุกรหย่านมที่ทำการผสมขึ้นโดยปราศจากยาปฏิชีวนะ ซึ่งคำนวณคุณค่าทางโภชนะตามความต้องการของสุกรหย่านมตามคำแนะนำของ NRC (1998) สูตรอาหารดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 และอาหารในกลุ่มที่ 6 เป็นอาหารสำเร็จรูปชนิดอัดเม็ดที่ใช้ในฟาร์มในรูปแบบการค้า (เบทาโกร®) โดยมีวัตถุดิบหลักเช่นเดียวกับอาหารทดลองในกลุ่มที่ 1 - 5 แต่มีการเสริมยาปฏิชีวนะและเคมีภัณฑ์สำหรับรักษาคุณภาพอาหารลงไป ซึ่งการทดลองนี้ใช้กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่ม negative control กลุ่มที่ 2 - 5 เป็นกลุ่มทดลองสมุนไพร และกลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่ม positive control โดยในกลุ่มที่ 2 - 5 มีการเสริมสมุนไพรดังนี้ กลุ่มที่ 2 เสริมใบฝรั่งป่นปริมาณ 0.64 กรัม / กิโลกรัมน้ำหนักตัว / วัน กลุ่มที่ 3 เสริมสารสกัดหยาบจากใบฝรั่งปริมาณ 0.02 กรัม / กิโลกรัมน้ำหนักตัว / วัน กลุ่มที่ 4 เสริมใบคูนป่นปริมาณ 3.77 กรัม / กิโลกรัมน้ำหนักตัว / วัน และกลุ่มที่ 5 เสริมสารสกัดหยาบจากใบคูนปริมาณ 0.16 กรัม / กิโลกรัมน้ำหนักตัว / วัน ในกรณีที่สุกรเกิดอาการท้องร่วง จะทำการรักษาโดยการป้อนน้ำเกลือแร่โออาร์เอส จนกระทั่งสุกรมีอาการกลับเป็นปกติ

ในการทดลองนี้มีจำนวนสุกรในแต่ละกลุ่ม (ค่า n) ไม่เท่ากัน เนื่องจากในบางกลุ่มการทดลองมีสุกรเสียชีวิตในระหว่างการทดลอง จึงทำการทดลองซ้ำเพื่อความสมบูรณ์ของข้อมูล ทำให้มีค่า n สูงกว่ากลุ่มอื่น และเนื่องจากในช่วงท้ายของการทดลองขาดแคลนลูกสุกรทดลอง ทำให้ไม่สามารถเสริมจำนวนสุกรให้มีจำนวนใกล้เคียงกันได้ เพราะการทดลองมีระยะเวลาจำกัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของอาหารสุกรหย่านมในกลุ่มที่ 1 - 5

วัตถุดิบ	g kg^{-1} diet	คุณค่าทางโภชนะ	% as fed basis
ข้าวโพด	33.8	โปรตีน	20.0
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 % CP)	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 600,000 IU; Vit E 10,000 IU; Vit K_3 0.8 g; Vit B_1 1.6 g; Vit B_2 1.6 g; Vit B_3 0.4 g; Vit B_{12} 8.0 g; Pantotenic acid 5.0 g; Niacin 12.0 g; Biotin 0.01 g; Folic acid 0.4 g; Cu 35.0 g; Zn 24.0 g; Mn 12.0 g; Fe 40.0 g; Co 0.2 g; Se 0.4 g and T 0.40 g (ลักษมณ์ภักดิ์คณา, 2549)

2.3 การบันทึกข้อมูลและการเก็บตัวอย่าง

2.3.1 บันทึกปริมาณอาหารที่สุกรกิน ทำการบันทึกปริมาณอาหารที่สุกรกินทุกๆวัน โดยทำการชั่งน้ำหนักอาหารที่ให้และน้ำหนักอาหารที่เหลือในรางอาหาร ที่เวลา 8.00 น. ของทุกวัน โดยใช้เครื่องชั่งน้ำหนักขนาด 1 กิโลกรัม สำหรับคำนวณปริมาณอาหารที่สุกรกินในแต่ละวัน ซึ่งหาค่าได้จากการนำน้ำหนักอาหารที่สุกรกินเหลือในแต่ละวันไปลบออกจากปริมาณอาหารที่สุกรกินในแต่ละวัน ดังแสดงในสูตร

ปริมาณอาหารที่สุกรกินแต่ละวัน = ปริมาณอาหารที่ให้แต่ละวัน - ปริมาณอาหารที่เหลือแต่ละวัน
(กิโลกรัม / วัน)

2.3.2 การชั่งน้ำหนักสุกร โดยทำการชั่งน้ำหนักสุกรแต่ละตัวทุกๆ 4 วัน นับจากวันที่เริ่มการทดลอง โดยการชั่งน้ำหนักทุกครั้งจะชั่งก่อนให้อาหารในช่วงเช้า โดยใช้ตะกร้าและเครื่องชั่งน้ำหนักขนาด 60 กิโลกรัม สำหรับชั่งน้ำหนักสุกร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.3 บันทึกลักษณะสุขภาพของสุกร

บันทึกลักษณะสุขภาพของลูกสุกรในวันที่ 1 (อายุ 21 วัน), 3, 5, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31 และ 35 ของการทดลอง โดยทำการบันทึกตามลักษณะต่างๆ ดังนี้

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

ในการทดลองนี้ประเมินการเกิดท้องร่วงโดยสังเกตจากลักษณะอุจจาระสุกรบนพื้นคอกรายวัน ร่วมกับคะแนนที่ได้จากการประเมินค่าลักษณะรูปร่างของมูลสุกร ซึ่งมีการบันทึกคะแนนพร้อมกับการเก็บตัวอย่างอุจจาระไปตรวจนับปริมาณเชื้อ *E. coli* ในห้องปฏิบัติการ โดยนับว่าตั้งแต่วันที่สุกรแสดงถึงอาการท้องร่วง คือมีลักษณะรูปร่างมูลที่ 3 - 5 คะแนน จนกระทั่งสุกรมีลักษณะรูปร่างมูลคงรูปเป็นปกติที่ 1 - 2 คะแนน เป็นการเกิดท้องร่วงจำนวน 1 ครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.4 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างอุจจาระสุกรในช่วงเช้า เพื่อใช้ในการตรวจหาปริมาณเชื้อ *E. coli* จากอุจจาระในวันที่ 1 (อายุ 21 วัน), 3, 5, 7, 11, 15, 19, 23, 27, 31 และ 35 ของการทดลอง เพื่อสังเกตผลในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ในระบบทางเดินอาหารของใบฝรั่งและใบคูนในสุกรหย่านม

วิธีเก็บตัวอย่างอุจจาระสุกร โดยใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์เช็ดปากทวารสุกรเพื่อทำการฆ่าเชื้อรอสักครู่เพื่อให้แอลกอฮอล์แห้งสนิท จากนั้นใช้นิ้วที่สวมถุงมือปราศจากเชื้อสอดเข้าช่องทวารหนักของสุกร เพื่อกระตุ้นให้สุกรถ่ายอุจจาระออกมา โดยใช้อุ้งมือรองอุจจาระที่สุกรถ่ายออกมา หลังจากนั้นนำตัวอย่างอุจจาระที่ได้บรรจุใส่ในถุงพลาสติกแบบมีซิปที่ปราศจากเชื้อ รูดซิปปิดปากถุงและบันทึกข้อมูลที่ตัวถุง โดยเก็บรักษาตัวอย่างอุจจาระสุกรในกระติกน้ำแข็งที่อุณหภูมิประมาณ 4 °C ก่อนนำไปตรวจนับหาปริมาณเชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างอุจจาระด้วยวิธี pour plate ในห้องปฏิบัติการต่อไป

2.4 การศึกษาสมรรถภาพการผลิต

2.4.1 วัดปริมาณอาหารทั้งหมดที่สุกรกิน (total feed intake, TFI) โดยวัดตั้งแต่เริ่มการทดลองจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง หาค่าได้จากการนำปริมาณอาหารที่สุกรกินในแต่ละวัน ตั้งแต่เริ่มการทดลองจนถึงวันสุดท้ายของการทดลองทั้งหมดมารวมกัน โดยคำนวณปริมาณอาหารที่สุกรกินในแต่ละวันตามสูตรในข้อ 2.3.1

2.4.2 วัดปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อวัน (average daily feed intake, ADFI) หาค่าได้จากการนำปริมาณอาหารทั้งหมดที่สุกรกิน ตั้งแต่เริ่มการทดลองจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง หารด้วยจำนวนวันที่เลี้ยง เพื่อหาค่าเฉลี่ย ดังแสดงในสูตร

$$\text{ปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ยต่อวัน (กิโลกรัม / วัน)} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กินทั้งหมด (กิโลกรัม)}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง (วัน)}}$$

2.4.3 วัดน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นทั้งหมด (total weight gain, TWG) หาค่าได้จากการนำน้ำหนักตัวที่ชั่งครั้งแรกเมื่อเริ่มเข้าสู่การทดลองของสุกร ไปลบออกจากน้ำหนักตัวที่ชั่งครั้งสุดท้ายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง จะได้น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นของสุกร ดังแสดงในสูตร

น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กิโลกรัม) = น้ำหนักตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง - น้ำหนักตัวเริ่มต้นการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.4 วัดอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (average daily gain, ADG) หาค่าได้จากการนำน้ำหนักตัวที่ชั่งครั้งแรกเมื่อเริ่มเข้าสู่การทดลองของสุกร ไปลบออกจากน้ำหนักตัวที่ชั่งครั้งสุดท้ายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง จะได้น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นของสุกรตั้งแต่เริ่มการทดลอง แล้วนำจำนวนวันที่เลี้ยงมาหารเพื่อหาค่าเฉลี่ย ดังแสดงในสูตร

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (กิโลกรัม / วัน)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กิโลกรัม)}}{\text{จำนวนวันที่เลี้ยง (วัน)}}$$

2.4.5 วัดอัตราการเปลี่ยนอาหาร หรืออัตราแลกเนื้อ (feed conversion ratio, FCR) หาค่าได้จากการนำปริมาณอาหารทั้งหมดที่สุกรกินตั้งแต่เริ่มการทดลองจนถึงวันสุดท้ายของการทดลอง หารด้วยน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ซึ่งหาได้จากการนำน้ำหนักตัวที่ชั่งครั้งแรกเมื่อเริ่มเข้าสู่การทดลองของสุกร ไปลบออกจากน้ำหนักตัวที่ชั่งครั้งสุดท้ายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในสูตร

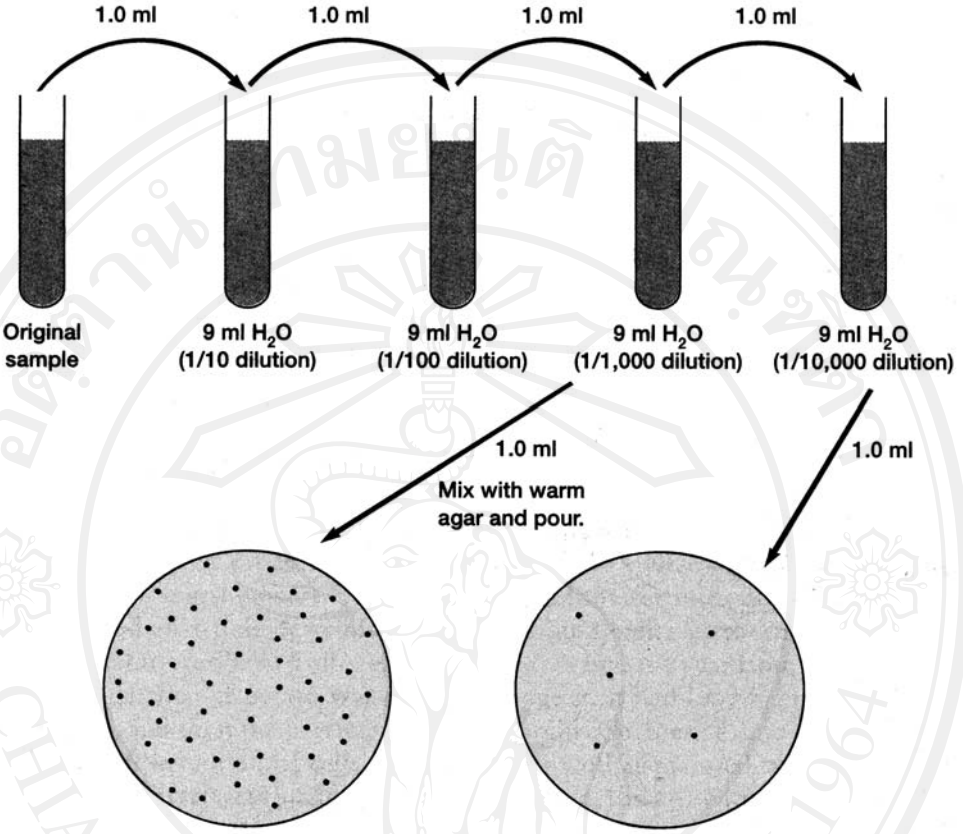
$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหาร} = \frac{\text{ปริมาณอาหารที่กิน (กิโลกรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (กิโลกรัม)}} \quad \text{หรือ} \quad \left(\frac{\text{Feed}}{\text{Gain}}\right)$$

2.5 การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

2.5.1 การตรวจนับเชื้อ *E. coli* จากตัวอย่างอุจจาระ

การตรวจนับเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี pour plate เป็นวิธีที่นอกจากจะแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ แล้วยังสามารถตรวจนับจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างที่นำมาแยกเชื้อได้ด้วย วิธีการนี้เป็นการนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตวิธีหนึ่งที่ใช้เทคนิคในการทำให้ไร้เชื้อหรือตัวอย่างเจือจาง (dilution) ด้วยน้ำ หรือ 0.85 % normal saline solution (NaCl) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และทราบปริมาตรที่แน่นอน ซึ่งปกติจะทำให้เจือจางเพิ่มขึ้นครั้งละ 10 เท่าเป็นลำดับ (ten fold serial dilution) เพื่อให้ง่ายต่อการปฏิบัติและการคำนวณ โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย 1 มิลลิลิตร หยดไปบนจานอาหารแล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 44 - 46 °C ลงไป ดังภาพที่ 15 ผสมเชื้อแบคทีเรียให้เข้ากับอาหารโดยแกว่งจานอาหารไปมาเบาๆ ทิ้งให้อาหารแข็งตัวแล้วนำไปบ่ม ภายหลังบ่มแล้ว โคโลนีของแบคทีเรียจะเจริญทั้งในและบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นับจำนวนแบคทีเรียในจานอาหารที่มีโคโลนีของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 30 - 300 โคโลนีหรือ colony forming unit (CFU) ก็จะทำให้สามารถคำนวณหาเชื้อแบคทีเรียต่อมิลลิลิตรหรือต่อกรัมตัวอย่างได้ (ศิววรรณ, 2549)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 15 การทำเจือจางเป็นลำดับและวิธีทำ pour plate (ศิววรรณ, 2549)

- วิธีทำการเจือจาง (dilution method)

- ใช้ออโตปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร ปิเปต 0.85 % NaCl จากภาชนะบรรจุออกมาครั้งละ 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 16 x 100 มิลลิเมตร พร้อมฝาปิด จำนวน 8 หลอดต่อการทดลอง 1 ตัวอย่าง แล้วนำไปทำให้ไร้เชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 - 20 นาที

- ชั่งตัวอย่างอุจจาระที่ต้องการแยกเชื้อมา 1 กรัม ละลายด้วย 0.85 % NaCl 9 มิลลิลิตรจากหลอดทดลองที่ 1 ที่จัดเตรียมไว้ ในถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ ใช้มือบดจนสารละลายเข้ากันเป็นเนื้อเดียว วิธีการนี้จะทำให้ตัวอย่างอุจจาระนั้นถูกทำให้เจือจางลง 10 เท่า หรือเท่ากับอัตราการเจือจางที่ 1 : 10

- ใช้ออโตปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากถุงพลาสติกมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ 2 ซึ่งมี 0.85 % NaCl 9 มิลลิลิตร ดูดสารละลายในหลอดทดลองขึ้นลงเพื่อล้างปิเปต จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นปิดฝาแล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex ในขั้นนี้เชื้อจะถูกเจือจางลงไปอีก 10 เท่า เป็น 1 : 10^2 ทิปที่ใช้แล้วให้ทิ้งใส่ภาชนะที่ใส่น้ำยาฆ่าเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- จากนั้นใช้ออโตปิเปต ซึ่งเปลี่ยนทิปอันใหม่แล้ว ปิเปตสารละลายจากหลอดทดลองที่ 2 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่ 3 ซึ่งมี 0.85 % NaCl 9 มิลลิลิตร ดูดสารละลายขึ้นลงเพื่อล้างปิเปต ปิดฝาแล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex ทำให้เชื้อถูกเจือจางลงไปอีก 10 เท่า ทำให้มีการเจือจางจากจุดเริ่มต้นทั้งหมด 1,000 เท่า หรือเท่ากับ $1 : 10^3$ โดยทิปที่ใช้แล้วให้ทิ้งใส่ภาชนะที่ใส่น้ำยาฆ่าเชื้อ
- เมื่อผสมเข้ากันดีแล้ว ให้ทำการเจือจางเช่นนี้ลงไปเรื่อยๆจนถึงอัตราความเจือจางที่ $1 : 10^8$ โดยเปลี่ยนทิปทุกครั้งเมื่อปิเปตสารละลายตัวอย่างจากหลอดหนึ่งไปสู่อีกหลอดหนึ่ง

- วิธีทำ pour plate

- ใช้ออโตปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายตัวอย่างจากหลอดทดลองที่เจือจางเป็น $1 : 10^5$, $1 : 10^6$, $1 : 10^7$ และ$1 : 10^8$ ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเปล่าที่ฆ่าเชื้อแล้วจานละ 1 มิลลิลิตร โดยทำ 2 จานต่อ 1 dilution เพื่อทำ duplicate และเปลี่ยนทิปทุกครั้งที่ดูดสารละลายต่าง dilution
- นำอาหารวุ้น EMB agar ซึ่งอยู่ในสภาพหลอมเหลวในขวดอาหารจาก water bath ที่อุณหภูมิ 45 °C มาเทลงในจานที่ใส่สารละลายตัวอย่างในแต่ละ dilution โดยในขณะที่เทใช้ฝาจานป้องกันส่วนผสมข้างในไม่ให้เชื้อจากอากาศตกลงไป
- หมุนจานไปมาให้สารละลายตัวอย่างผสมเข้ากันดีกับ EMB agar เพื่อให้เชื้อกระจายตัวทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ ระวังอย่าให้กระฉอกไปติดฝาจาน
- ตั้งทิ้งไว้จนวุ้นแข็งตัว แล้วจึงกลับจานเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำที่ติดบนฝาจานหยดลงมาบนอาหาร
- นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง เมื่อเพาะเชื้อจนเจริญขึ้นเป็นโคโลนีจึงนำไปนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ได้

- วิธีนับจำนวนโคโลนี

ทำได้โดยเลือกชุดจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. coli* เจริญอยู่ประมาณ 30 - 300 โคโลนีจากความเจือจางเดียว ถ้าทำ 2 จาน ให้หาค่าเฉลี่ยบนจำนวนจานอาหารทั้งสอง แล้วจึงคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียต่อกรัมของตัวอย่าง โดยจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างที่นำมาตรวจนับสามารถนำมาคำนวณได้ดังนี้

$$\text{จำนวนแบคทีเรีย} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบนจาน}}{\text{ความเจือจางของตัวอย่างที่นำมาทดสอบ}}$$

โดยนิยมรายงานเป็น CFU (colony forming unit) ต่อกรัม หรือต่อมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เช่น ถ้าตัวอย่างอุจจาระ 1 กรัม ที่ความเจือจาง 1,000,000 เท่า ($1 : 10^6$) เมื่อนำไปผสมกับ EMB agar ในจานและนำไปเพาะ ปรากฏว่ามีโคโลนีของเชื้อ *E. coli* เกิดขึ้น 250 โคโลนี จำนวนแบคทีเรียในตัวอย่าง 1 กรัม จะเท่ากับ 250 หารด้วย $1 / 10^6$ หรือเท่ากับ 250,000,000 เซลล์ หรือ 2.5×10^8 โคโลนี

โดยจำนวนโคโลนีที่ความเจือจางที่สูงควรน้อยกว่าจำนวนโคโลนีที่ความเจือจางที่ต่ำลงมาประมาณ 10 เท่า เนื่องจากในการทดสอบทำให้เจือจาง 10 เท่า ถ้าหากผลที่ออกมาคลาดเคลื่อนมากคือไม่เกิน 10 เท่า แสดงว่ามีความผิดพลาดเนื่องจากการที่ผสมเชื้อกับอาหารวุ้นไม่ดี หรือการทำเจือจางไม่ดี และจำนวนโคโลนีที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการคำนวณจำนวนโคโลนี ควรอยู่ระหว่าง 30 - 300 โคโลนี จากจานที่มีโคโลนีมากและกระจายอยู่สม่ำเสมอ (ศศิธร และคณะ, มปป.)

2.6 การวางแผนการทดลองทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลองโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's test และ Regression test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (มนต์ชัย, 2537)

2.7 สถานที่ทำการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ห้องปฏิบัติการคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ห้องปฏิบัติการคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
คอกสัตว์ทดลอง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.8 ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย

ประมาณ 12 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved