บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเพาะเลี้ยงและศึกษาการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกสำหรับสุกรในน้ำทิ้งจากการต้มเส้นขนมจีน

จากการแยกและคัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกสำหรับสุกรของการทดลองในปีที่ ๑ นั้น คัดเลือกได้เชื้อ lactic acid bacteria (LAB) strain SK5 ซึ่งแสดงประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารในสุกร แต่เนื่องจากเชื้อ LAB strain SK5 นี้ไม่สร้างเอนไซม์ amylase จึงไม่สามารถใช้แป้งในน้ำทิ้งจาการต้มเส้นขนมจีนเพื่อใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงานในการเจริญได้ ดังนั้นจึงได้นำเชื้อ *Bacillus coagulans* NF17 ซึ่งเป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์ amylase ได้ดี และมีประสิทธิภาพในการสร้างกรดแลคติกและทนอุณหภูมิสูง (ดาราวรรณ และเสาวนิต, 2548) มาเพาะเลี้ยงในน้ำทิ้งจาการต้มเส้นขนมจีนเร่วมกับเชื้อ LAB strain SK5 เพื่อให้เชื้อ *B. coagulans* NF17 ย่อยแป้งให้ได้น้ำตาลและเชื้อโปรไบโอติก LAB strain SK5 สามารถใช้น้ำตาลนั้นในการเจริญได้

ทำการศึกษาการเจริญของเชื้อ LAB strain SK5 ร่วมกับเชื้อ *Bacillus coagulans* NF 17 ในน้ำต้มเส้นขนมจีนดังนี้

3.1.1. เตรียม inoculum ของเชื้อ LAB strain SK5 ในอาหาร MRS broth บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อ *Bacillus coagolans* NF 17 โดยเตรียม inoculum ของเชื้อในอาหาร Glucose Yeast extract Peptone (GYP) broth บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

3.1.2. อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ LAB strain SK5 และ *Bacillus coagolans* NF 17 ได้แก่น้ำต้มเส้นขนมจีนที่ไม่เติมและเติมน้ำนมยูเอชที 10 % โดยเตรียมให้มีปริมาตร 100 มล. ใน flask ขนาด 250 มล. ปิเปตเชื้อ SK 5 และ NF 17 ลงอาหารที่เตรียมในอัตราส่วน 1: 1 โดยปริมาตรโดยให้มี % inoculum ของแต่ละเชื้อเป็น 1 เปอร์เซ็นต์

3.1.3. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจนับปริมาณเชื้อในแต่ละวัน เป็นเวลา 3 วันตรวจนับเชื้อโดยวิธี spread plate technique ซึ่งเชื้อ SK 5 จะนับบนอาหาร MRS ส่วนเชื้อ NF 17 จะตรวจผลบนอาหาร GYP ที่มีส่วนผสมของ $CaCO_3$ อยู่ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยบ่มที่ 30 และ 42 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2 ศึกษาปริมาณเชื้อโปรไบโอติกและเชื้อแบคทีรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ในสุกรทดสอบ

สุกรที่ใช้ในการทดลองได้แก่พันธุ์ลาร์จไวท์ (Large white) เป็นลูกสุกรหลังหย่านมโดยมาจากแม่สุกรเดียวเพื่อลดความเบี่ยงเบนในเรื่องพันธุ์กรรม ซึ่งจะประกอบไปด้วยกลุ่มควบคุม (ไม่มีการให้เชื้อ

โปรไบโอติก) และกลุ่มทดสอบคือกลุ่มที่ที่ให้เชื้อโปรไบโอติก แต่ละกลุ่มประกอบด้วยลูกสุกร 6 ตัว โดยแบ่งเพศของลูกสุกรให้คละกัน ทำการชั่งน้ำหนักและบันทึกข้อมูลก่อนเริ่มการทดลอง

3.2.1 ตรวจปริมาณเชื้อที่มีอยู่ในสุกรก่อนเริ่มการทดลอง นำไปตรวจเชื้อต่าง ๆ ดังนี้ กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae และ ตรวจนับจำนวนเชื้อ *Salmonella* ในตัวอย่างมูลสุกร

3.2.2 ให้ลูกสุกรกินเชื้อโปรไบโอติกได้แก่เชื้อผสมระหว่างไอโซเลท SK 5 กับเชื้อ *Bacillus coagulans* NF17 (เลี้ยงในน้ำต้มส้นขนมจีนที่มีน้ำนม 10%)โดยให้มีเชื้อโปรไบโอติกประมาณ 10^9-10^{10} CFU/สุกร/วัน ให้กินต่อเนื่องทุกวันในกลุ่มทดลอง ส่วนในกลุ่มควบคุมจะให้กินน้ำต้มส้นขนมจีนที่มีน้ำนม 10% ในปริมาณที่เท่ากันกับกลุ่มทดสอบ

3.2.3 ตรวจนับจำนวนประชากรแบคทีเรีย กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae จากตัวอย่างมูลสุกรในวันที่ 7, 14, 21, 28, 42, 49 หลังได้รับเชื้อโปรไบโอติก

3.3 ทำ "challenged test" ในสุกรด้วยเชื้อก่อโรคท้องร่วง *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis NIH 2392

หลังจากเลี้ยงสุกรด้วยอาหารที่ผสมแบคทีเรียโปรไบโอติกเป็นเวลา 19 วัน จึงทำ "challenged test" โดยให้สุกรทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบกินอาหารที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อ *Salmonella* Choleraesuis NIH 2392 ในปริมาณ 10^8 cell/ สุกร/ วัน โดยให้เชื้อซัลโมเนลลาติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน ทำการตรวจนับจำนวน *Sallmonella* ในมูลสุกรหลังจาการให้เชื้อซัลโมเนลลา 2 วันและ 4 วัน คือวันที่ 21 และ 23 ของการเลี้ยงสุกร โดยใช้ MPN techniques ร่วมกับการตรวจซัลโมเนลลาตามวิธีของ FDA-BAM (Andrews et. al., 2001)

3.4 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของน้ำทิ้งจากการต้มเส้นขนมจีนที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อ LAB strain SK5 และ *Bacillus coagolans* NF 17

3.4.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้น้ำต้มเส้นขนมจีนที่ได้วิเคราะห์ปริมาณแป้งในรูปของ total sugar แล้วด้วยวิธี phenol-sulfuric acid method มาเจือจางให้มีความเข้มข้นของปริมาณแป้งประมาณ 2% แล้วเตรียมปริมาตร 180 มล. ใส่ฟลาสก์ขนาด 500 มล. หลังจากนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 120 °C เป็นเวลา 15 นาทีแล้ว เติมนม UHT 10% ก่อนนำไปใช้เลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกส์

3.4.2 เตรียม inoculums ของเชื้อ *Bacillus coagulans* NF17 โดยเลี้ยงใน GYP broth (glucose 2%, yeast extract 0.5% และ peptone 0.5%) บ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ LAB strain SK5 เลี้ยงใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.3 ใช้ inoculum ของเชื้อ *Bacillus coagulans* NF17 ปริมาตร 5% เลี้ยงในอาหารที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนที่จะ inoculate ด้วยเชื้อ LAB strain SK5 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบเวลาแล้วตรวจนับปริมาณเชื้อ *Bacillus coagulans* NF17 ด้วยวิธี plate count technique โดยใช้ GYP agar ที่ผสม $CaCO_3$ 0.5% และปริมาณเชื้อ LAB strain SK5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสม $CaCO_3$ 0.5% และนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในรูปของ total Kjedahl nitrogen เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำต้มเส้นขนมจีนที่เติมนม UHT 10% ซึ่งไม่มีการ inoculate ด้วยเชื้อโปรไบโอติกส์ โดยทำการทดลองละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกันทางสถิติ

3.5 การเพาะเลี้ยงและศึกษาการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกสำหรับสัตว์ปีกในน้ำทิ้งจากการต้มเส้นขนมจีน

จากการแยกและคัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกสำหรับสัตว์ปีกของการทดลองในปีที่ ๑ นั้น คัดเลือกได้เชื้อ lactic acid bacteria (LAB) strain LAB42 และ *Bacillus* sp. strain OB8 ซึ่งแสดงประสิทธิภาพดีที่สุดของกลุ่ม lactic acid bacteria และ *Bacillus* ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารในสัตว์ปีกตามลำดับ โดยที่ไอโซเลท LAB42 และ OB8 ต่างสามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสออกมาย่อยแป้งในน้ำต้มเส้นขนมจีนได้ จึงทำการเพาะเลี้ยงเพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการเป็นโปรไบโอติกแยกจากกันดังนี้

3.5.1 เลี้ยงเชื้อไอโซเลต LAB42 ในอาหาร MRS broth บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส และ OB8 ในอาหาร Mixed NB (glucose 0.5%, yeast extract 0.1%, peptone 0.5%, beef extract 0.3% และ $MgSO_4$. $7H_2O$ 0.05%) บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น inoculum

3.5.2 เตรียมน้ำต้มเส้นขนมจีนที่เติมน้ำนมยูเอชที 10% ปริมาตร 100 มล.ในฟลาสก์ 250 มล. ไปเปต inoculum ของไอโซเลต LAB42 และ OB8 ปริมาณ 1% มาเลี้ยงในน้ำต้มเส้นขนมจีนที่เติมนม 10% บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียสตามลำดับ ตรวจนับจำนวนเชื้อในแต่ละวันด้วยวิธี spread plate technique เป็นเวลา 3 วัน โดยนับเชื้อไอโซเลต LAB42 บนอาหาร MRS agar ที่มี $CaCO_3$ ปริมาณ 0.5% และ OB8 บนอาหาร Mixed NA

3.6 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้ในไก่กระทง (Ribeiro et. al., 2007)

3.6.1 การเตรียมเชื้อไอโซเลต LAB42 ผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงไก่

เตรียม inoculum ของเชื้อ LAB42 โดยเลี้ยงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 150 มล. บ่มที่ 30°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปต inoculum ปริมาตร 5% ลงในน้ำต้มเส้นขนมจีนที่ผสมนมยูเอชที 10% บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจนับจำนวนของเชื้อ LAB42 ก่อนนำไปผสมลงในอาหารไก่

3.6.2 การเตรียมเชื้อไอโซเลต OB8 ผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงไก่

เตรียม inoculum ของ *Bacillus* OB8 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร Mixed NB ปริมาตร 150 มล. บ่มที่ 35°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปต inoculum ปริมาตร 5% ลงในน้ำต้มเส้นขนมจีนที่ผสมนมยูเอชที 10% บ่มที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจนับจำนวนของ *Bacillus* OB8 ก่อนนำไปผสมลงในอาหารไก่

3.6.3 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดเลือกในไก่ทดลอง

เตรียมไก่กระทง พันธุ์ Ross 1 อายุหนึ่งวัน จำนวน 120 ตัว คละเพศ มาชั่งน้ำหนักและแบ่งกลุ่มไก่แบบสุ่มตลอด (allot) ออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง (treatment) ได้แก่

กลุ่มที่ 1 (T1) : ไก่ได้รับอาหารผสมน้ำต้มเส้นขนมจีนที่เติมนม 10%

กลุ่มที่ 2 (T2) : ไก่ได้รับอาหารผสมยาปฏิชีวนะคลอเตตระไซคลิน 50 ppm

กลุ่มที่ 3 (T3) : ไก่ได้รับอาหารผสม lactic acid bacteria strain LAB42 ที่เลี้ยงในน้ำต้มเส้นขนมจีนที่เติมนมยูเอชที 10% ปริมาณ 10^9 CFU/g อาหาร

กลุ่มที่ 4 (T4) : ไก่ได้รับอาหารผสม *Bacillus* OB8 ที่เลี้ยงในน้ำต้มเส้นขนมจีนที่เติมนม 10% ปริมาณ 10^9 CFU/g อาหาร

ปรับให้ไก่ชินกับอาหารและสภาวะทดลองก่อนเริ่มทำการทดลอง เป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ จากนั้นทดลองเลี้ยงไก่ตามกลุ่มการทดลองที่จัดไว้ เป็นเวลา 28 วันทดลอง (ไก่จะมีอายุ 35 วัน) โดยนับวันแรกที่ไก่ทดลองได้รับอาหารตามกลุ่มการทดลองที่จัดให้เป็นวันที่ 0 ของการทดลอง และจัดให้ไก่ในกลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกทั้งสองสายพันธุ์ได้รับเชื้ออย่างต่อเนื่องในปริมาณ 10^8 CFU ต่อตัวต่อวัน เมื่อเลี้ยงไก่ไปแล้ว 7 วันทดลอง ทำ "challenged test" โดยให้เชื้อก่อโรคท้องร่วง *Salmonella* Enteritidis แก่ไก่ทดลองในปริมาณ 10^6 CFU ตรวจนับจำนวนเชื้อ lactic acid bacteria และ *Bacillus* จากมูลไก่ ในวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 ของการทดลอง โดยทำ dilution plate count บน MRS agar plate และ Mixed NA ตามลำดับ และตรวจนับจำนวนเชื้อซัลโมเนลลาจากมูลไก่ ในวันที่ 0, 7, 8, 9, 14, 21 และ 28 ของการทดลอง ตามวิธีของ US FDA–BAM ร่วมกับ MPN techniques บันทึกน้ำหนักไก่ทดลองเมื่อไก่มีอายุได้ 20 และ 35 วัน และปริมาณอาหารที่ไก่ได้รับทุกวัน เพื่อคำนวณหาค่าอัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio: FCR)

3.7 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของน้ำทิ้งจากการต้มเส้นขนมจีนที่ผ่านการหมักด้วยเชื้อ lactic acid bacteria strain LAB42 และ *Bacillus* OB8

3.7.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้น้ำต้มเส้นขนมจีนที่ได้วิเคราะห์ปริมาณแป้งในรูปของ total sugar แล้วด้วยวิธี phenol-sulfuric acid method มาเจือจางให้มีความเข้มข้นของปริมาณแป้งประมาณ 2% แล้วเตรียมปริมาตร 180 มล. ใส่ฟลาสก์ขนาด 500 มล. หลังจากนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 120 °C เป็นเวลา 15 นาทีแล้ว เติมนม UHT 10% ก่อนนำไปใช้เลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกส์

3.7.2 เตรียม inoculums ของเชื้อ *Bacillus* OB8 โดยเลี้ยงใน Mixed nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ LAB 42 เลี้ยงใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.7.3 ในการทดลองชุดที่ 1 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* OB8 ในน้ำต้มเส้นขนมจีนที่เสริมด้วยนม UHT 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ inoculum ของเชื้อ *Bacillus* OB8 ปริมาตร 5% นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการทดลองชุดที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ LAB 42 ในน้ำต้มเส้นขนมจีนที่เสริมด้วยนม UHT 10 เปอร์เซ็นต์โดยใช้ inoculum ปริมาตร 5% นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีน้ำต้มเส้นขนมจีนที่เสริมด้วยนม UHT 10 เปอเซ็นต์ที่ไม่มีการเติมเชื้อโปรไบโอติกเป็นชุดควบคุม โดยทำการทดลองชุดละ 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกันทางสถิติ

3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลการวิเคราะห์โปรตีนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโปรไบโอติกเพื่อนำไปเลี้ยงไก่ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ ทำการคำนวณหาค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ($X \pm SD$) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบแจกแจงทางเดียว (One-Way Anova) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยวิธีดันแคน (Duncan's new multiple range test, DMRT) สำหรับข้อมูลการวิเคราะห์โปรตีนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโปรไบโอติกเพื่อนำไปเลี้ยงสุกร นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Independent-Samples T Test โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)