อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1

1.หนังสัตว์ทดลอง

หนังสัตว์ของสุกรจากโรงฆ่าสัตว์ นำหนังมาตัดให้มีขนาด 21 x 30 cm. (ขนาดเท่ากระดาษ A4) จำนวน 3 แผ่น/ 1 ซ้ำ ใช้ในการทดลองนี้ใช้ทั้งหมด 3 ซ้ำ/ เชื้อจุลินทรีย์ 1 ตัว

2. เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *E. coli* และเชื้อ *Salmonella* Typhimurium

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1) TSB-YE

2) TSA-YE

3) Peptone 0.1 %

4) Glycerol 30 %

4.สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1) แอลกอฮอล์ (Alcohol) ความเข้มข้น 70 % และ 95 %

2) ยาเตตร้าเวทแอร์โรซอล (Tetravet Aerosol) และ ยาเบตาดีน (Betadine)

5.เครื่องมือ

1) ตู้ถ่ายเชื้อ (Larminar flow)

2) ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ (Bacteriological Incubator) อุณหภูมิตู้บ่ม 37 °C

3) ตู้อบ (Hot-air oven sterilizer) ฆ่าเชื้อโดยใช้ลมร้อนหมุนเวียนภายในตู้อุณหภูมิ 180 °C (350 °F) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อุปกรณ์จำพวกเครื่องแก้ว

4) หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Autoclave sterilizer) สามารถฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C (249.8 °F) เป็นเวลา 15 นาที

5) เครื่องชั่งอิเลกทรอนิกส์ (Digital balancing)

6) ตู้อบไมโครเวฟ (Microware oven)

7) เครื่องเขย่าสาร (Vortex)

8) ตู้เย็น

9) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

10) ออโตเมติกปิเปต (Automatic pipet) และ Disposable tip

11) ปากคีบ (Forcep), กรรไกร และมีด

12) ตะเกียงแอลกอฮอล์

13) ถุงพลาสติก

14) ไม้พันก้านสำลี

15) ถาดโฟม

16) ตะแกรงใส่หลอด (Rack)

17) เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่างๆที่จำเป็นในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

18) สำลี

19) Tip

20) Eppem droff

การทดลองที่ 2

1.สัตว์ทดลอง

สุกรในฟาร์มคัดเลือกสุกรขุนอายุประมาณ6เดือน สุ่มแบ่งพื้นที่บนผิวหนังสุกรเป็น 3 ส่วน (ขนาดเท่ากระดาษ A4) จำนวน 1 ตัว/1ซ้ำ

2.อาหารเลี้ยงเชื้อ

1) PCA
2) NaCl 0.85%
3) LST
4) BGLB
5) EC
6) EMB
7) Tryptophane broth
8) MR-VP
9) Koser citrate broth

3.สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1) แอลกฮอล์ (Alchol) ความเข้มข้น 95%
2) ยาเตตร้าเวทแอร์โรซอล (Tetravet Aerosol®)

ซึ่งประกอบด้วย ใน 1 กรัม ประกอบด้วยตัวยาสำคัญ คืออ๊อกซี่เตตร้าซัยคลิน ไฮโดรคลอไรด์ 40 มิลลิกรัม เจนเซี่ยน ไวโอเล็ต 162 มิลลิกรัม (BOMAC LABORATORIES LTD, New Zealand)

3) ยาเบตาดีน (Betadine®)

ซึ่งประกอบด้วย povidone-iodine USP 10% w/v ;Mundipharma, Netherlands.

4) Kovacs reagent
5) Methyl red

6) 5% alcoholic α-naphthol solution (w/v)

7) 40% KOH

4.เครื่องมือ

1) ตู้ถ่ายเชื้อ (Larminar flow)

2) ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ (Bacteriological Incubator) อุณหภูมิตู้บ่ม 37 °C

3) ตู้อบ (Hot-air oven sterilizer) ฆ่าเชื้อโดยใช้ลมร้อนหมุนเวียนภายในตู้อุณหภูมิ 180 °C (350 °F) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อุปกรณ์จำพวกเครื่องแก้ว

4) หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Autoclave sterilizer) สามารถฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C (249.8 °F) เป็นเวลา 15 นาที

5) เครื่องชั่งอิเลกทรอนิกส์ (Digital balancing)

6) ตู้อบไมโครเวฟ (Microware oven)

7) เครื่องเขย่าสาร (Vortex)

8) ตู้เย็น

9) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

10) ออโตเมติกปิเปต (Automatic pipet) และ Disposable tip

11) Loop

12) ตะแกรงใส่หลอด

13) สำลี

14) ถุงพลาสติก

15) ตะเกียงแอลกฮอล์

16) ไม่พันก้านสำลี

17) ฟรอยด์

18) หนังยาง

19) เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่างๆที่จำเป็นในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

สถานที่ทำการทดลอง

ทำการทดลอง ณ ฟาร์มสุกรทดลองและห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาเนื้อสัตว์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

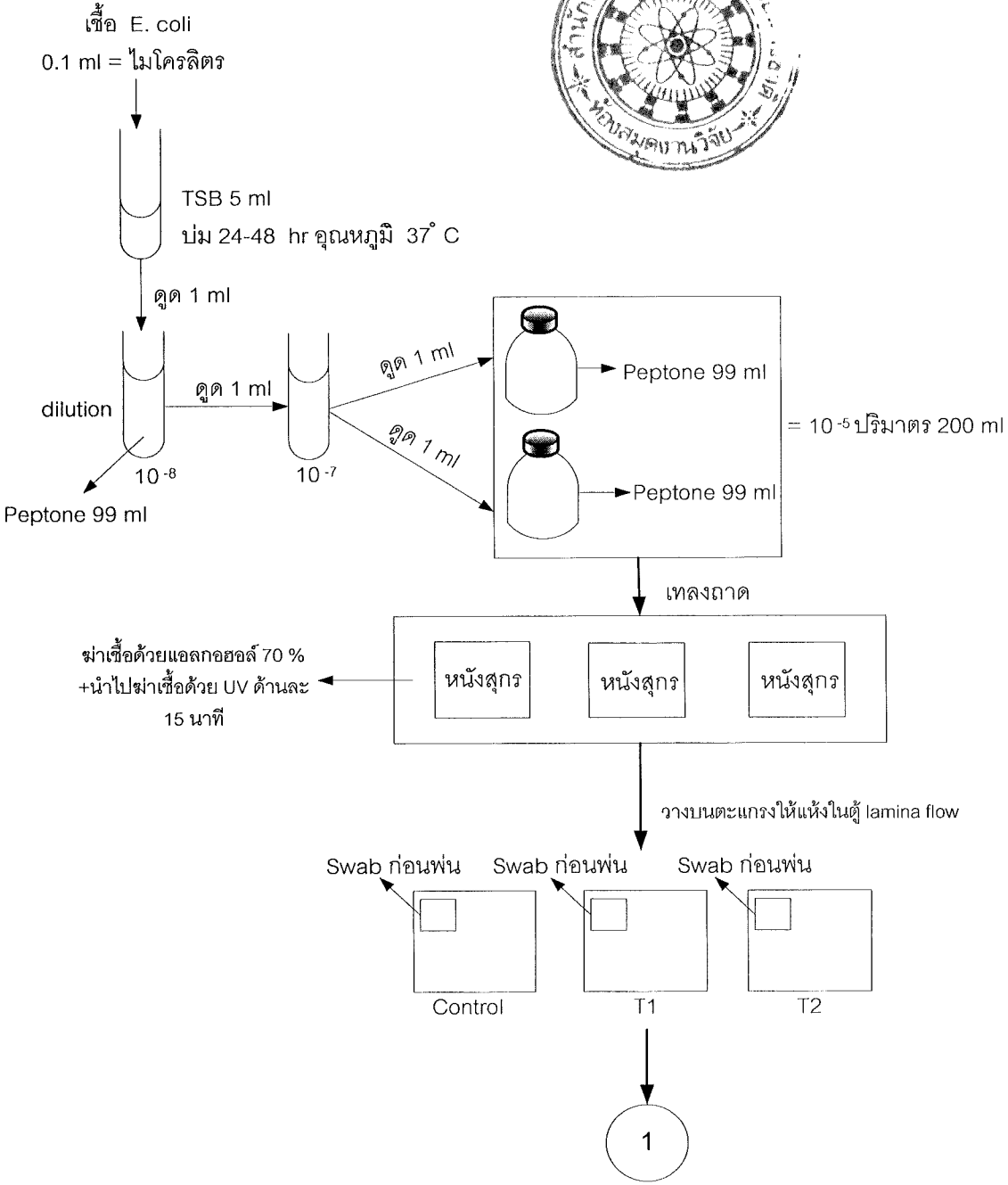
การทดลองที่ 1

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาออกซี่เตตร้าไซคลิน (Tetravet Aerosol®) และ Povidone Iodine (Povidine®) ในการลดปริมาณเชื้อจุลชีพบนแผ่นหนังสุกร โดยใช้เชื้อ *E. coli* และ *Salmonella* Typhimurium เป็นเชื้อทดสอบ

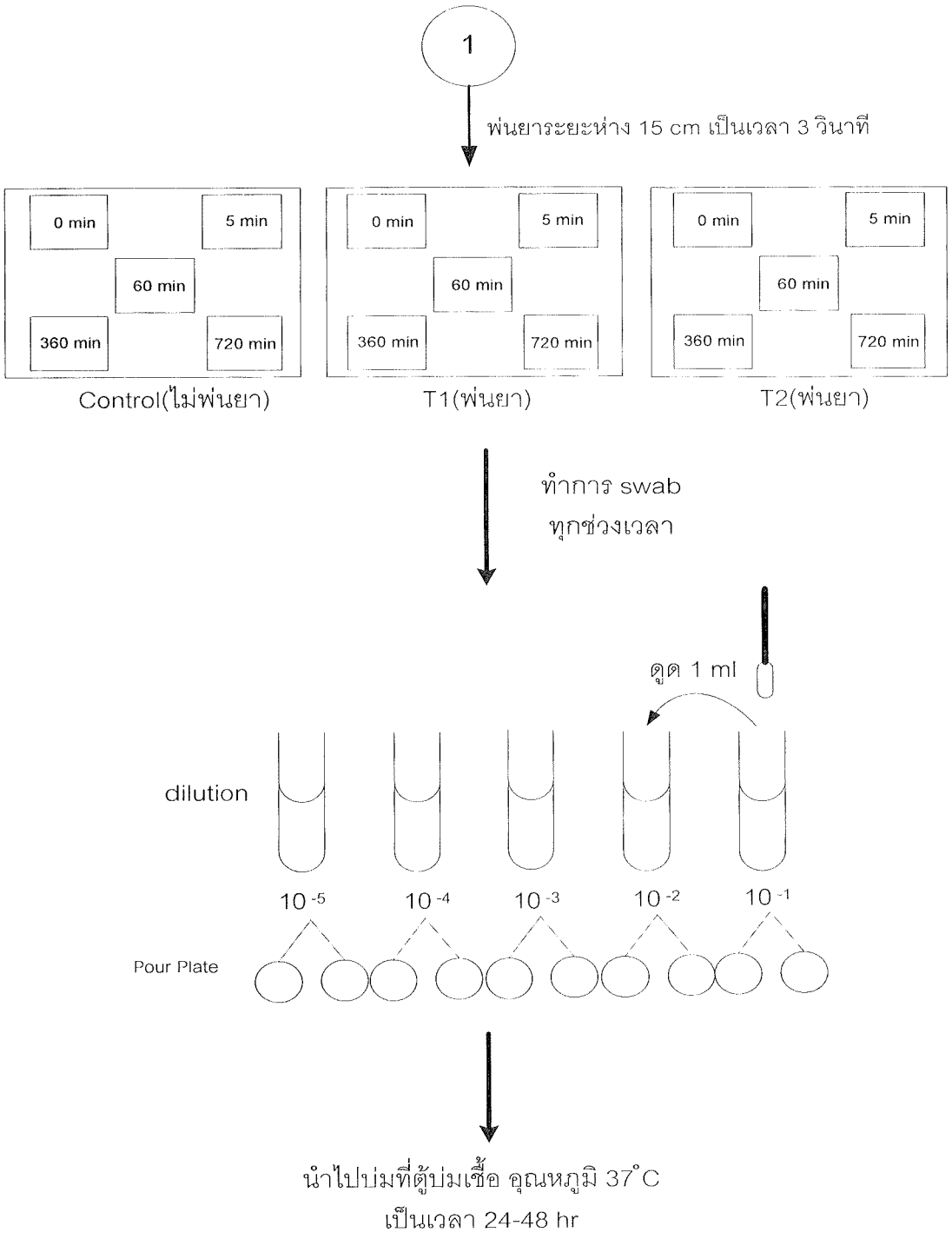
ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยเตรียมแผ่นหนังสุกรขนาด 21 x 30 เซนติเมตร จำนวน 18 แผ่น สำหรับทดสอบด้วยเชื้อ *E. coli* จำนวน 9 แผ่น และสำหรับทดสอบด้วยเชื้อ *Salmonella* Typhimurium จำนวน 9 แผ่น การทดสอบด้วยเชื้อแต่ละชนิดแบ่งเป็น 3 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ไม่ได้รับยาใดๆ กลุ่มที่ 2 ได้รับยา Tetravet Aerosol® และกลุ่มที่ 3 ได้รับยา Povidone Iodine โดยแต่ละกลุ่มมี 3 ซ้ำ (แผ่นหนัง 3 แผ่น)

ทำการฆ่าเชื้อแผ่นหนังสุกรโดยการแช่แผ่นหนังสุกรด้วยแอลกอฮอล์ 70% แล้วนำมาพึ่งไว้บนตะแกรงให้แห้งสนิท เมื่อแผ่นหนังแห้งแล้วจึงย้ายมาบนถาดโฟมที่สะอาดและผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% แผ่นละ 1 ถาด หลังจากนั้นนำหนังสุกรที่แห้งแล้วมาผ่านการฆ่าเชื้ออีกครั้งโดยการฉายรังสีอัลตร้าไวโอเลตในตู้ตู้ถ่ายเชื้อ (Larminar flow) ด้านละ 15 นาที ทั้ง 2 ด้าน ทำการเตรียมเชื้อ *E. coli* สำหรับทดสอบที่มีความเข้มข้น 10^{-5} ปริมาตร 200 ml จากนั้นนำหนังสุกรมาจุ่มเชื้อให้ทั่วทั้ง 3 แผ่น วางบนตะแกรงให้แห้งในตู้ถ่ายเชื้อ ทำการแบ่งแผ่นหนังเป็นช่องสี่เหลี่ยมขนาด 5 ตารางเซนติเมตร จำนวน 5 ช่อง สำหรับการเก็บเชื้อในแต่ละช่วงเวลา คือ 0 นาที (ก่อนเริ่มการทดลอง) 5 นาที 60 นาที 360 นาที และ 720 นาที ตามลำดับ

กลุ่มที่ 2 และ 3 ได้รับการฉีดพ่นยาโดยมีระยะห่างจากผิวหนังสุกร 15 cm เป็นเวลา 5 วินาที ให้ทั่วพื้นที่การเก็บตัวอย่างทำโดยการใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (autoclave) ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อ (swab) บนผิวหนังสุกรในช่องสี่เหลี่ยมขนาด 5 ตารางเซนติเมตร ที่ระยะเวลาต่างๆ นำไปใส่ในหลอดที่มี Peptone 0.1% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} และ 10^{-8} โดยแต่ละความเข้มข้นนำไปเทในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 2 จาน และนำไปเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง นับจำนวนตรวจหาปริมาณเชื้อ *E.coli* และ *Salmonella* Typhimurium ทั้งหมดที่ระยะเวลาต่างๆ



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 11 ส.ค. 2555
เลขทะเบียน 243129
เลขเรียกหนังสือ



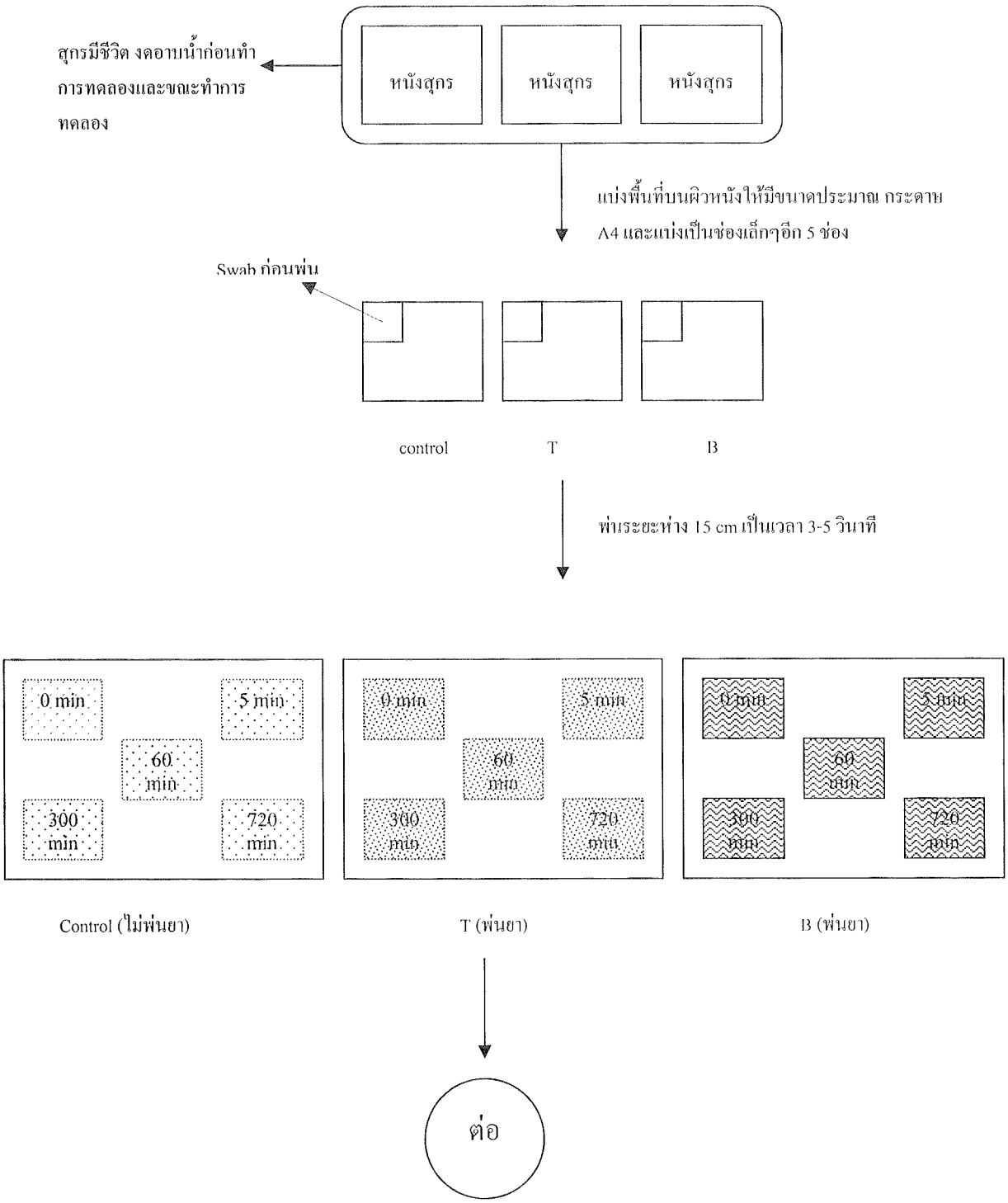
ภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการดำเนินของการทดลองที่ 1

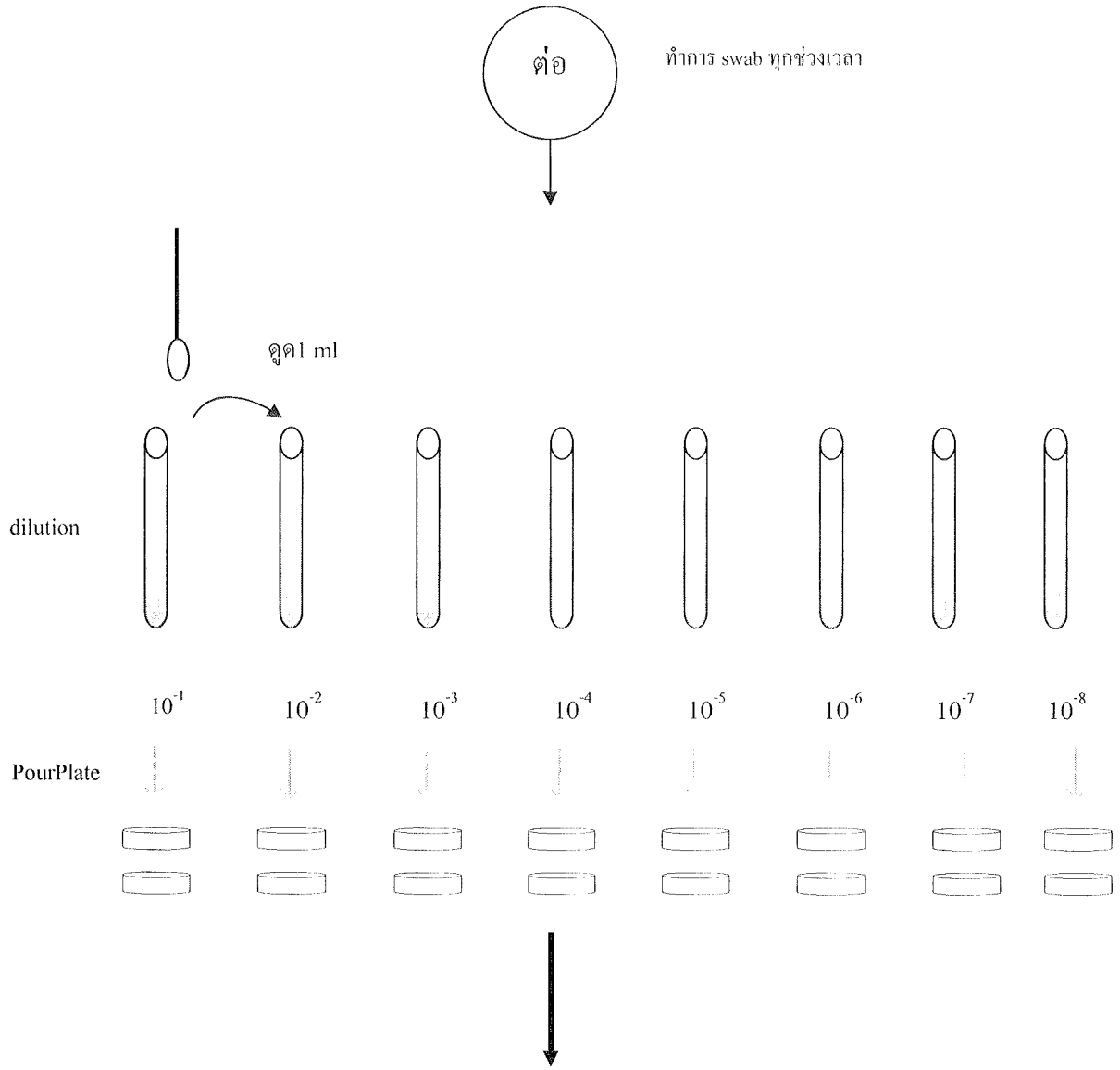
การทดลองที่ 2

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของยา Tetravet Acrosol® และ Povidine® ในการลดปริมาณเชื้อจุลชีพบนผิวหนังสุกรที่มีชีวิต โดยใช้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์รวมเป็นตัวชี้วัด ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

ทำการคัดเลือกสุกรขุนอายุ 6 เดือน จำนวน 3 ตัว ทำการงดอาบน้ำสุกรก่อนทำการทดลองและระหว่างทำการทดลอง ทำการสุ่มแบ่งพื้นที่บนผิวหนังสุกรบริเวณแนวกลางหลังสุกรจากด้านหัวไปหาง ขนาด 21 x 30 เซนติเมตร จำนวน 3 ช่องสำหรับ 3 กลุ่มทดลอง คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับยาชนิดใดๆ กลุ่มที่ 2 ได้รับยา Tetravet Acrosol® และ กลุ่มที่ 3 ได้รับยา Povidine® แต่ละช่องแบ่งเป็นช่องสี่เหลี่ยมขนาด 5 ตารางเซนติเมตร จำนวน 5 ช่องสำหรับการเก็บเชื้อในแต่ละช่วงเวลาต่างๆหลังจากพ่นยา คือ 0 นาที (ก่อนเริ่มการทดลอง) 5 นาที 60 นาที 360 นาที และ 720 นาที ตามลำดับ ทำการสลับตำแหน่งของกลุ่มการทดลองในสุกรแต่ละตัวที่ใช้ทดลอง

กลุ่มที่ 2 และ 3 ได้รับการฉีดพ่นยาโดยมีระยะห่างจากผิวหนังสุกร 15 cm เป็นเวลา 5 วินาที ให้ทั่วพื้นที่การเก็บตัวอย่างทำโดยการใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (autoclave) ทำการเขี่ยเชื้อ (swab) บนผิวหนังสุกรก่อนพ่นยา จากนั้นนำไปใส่ในหลอดที่มี NaCl 0.85% ปริมาตร 10 ml และทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7} และ 10^{-8} โดยแต่ละความเข้มข้นนำไปเทในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 2 จาน และนำไปเข้าตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง นับจำนวนตรวจหาเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่ระยะเวลาต่างๆ ด้วยวิธี MPN (รูปที่ 2และรูปที่ 3)

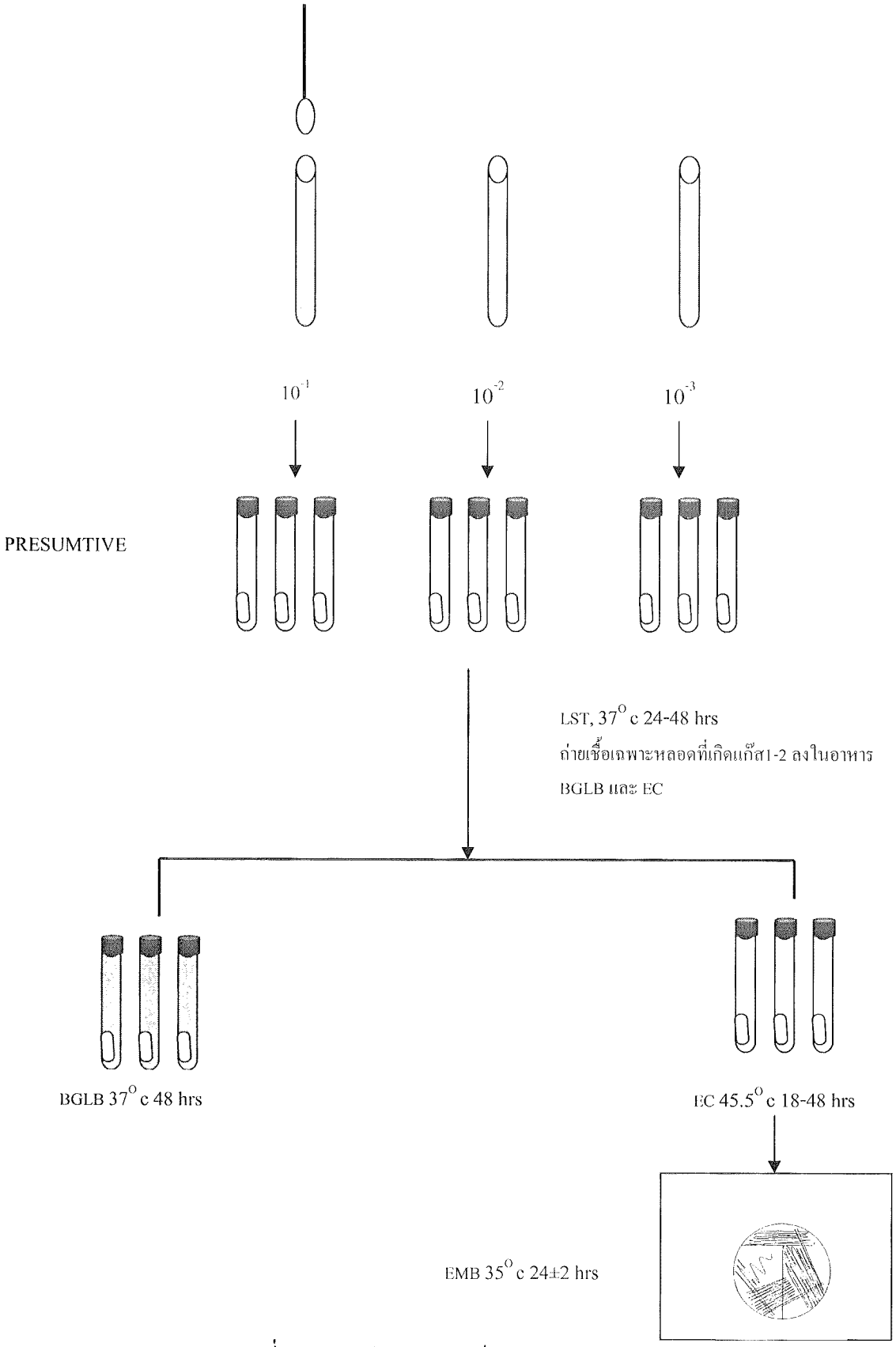

สุกรมีชีวิต งดอาบน้ำก่อนทำการทดลองและขณะทำการทดลอง
หนังสุกร
หนังสุกร
หนังสุกร
แบ่งพื้นที่บนผิวหนังให้มีขนาดประมาณ กระดาษ A4 และแบ่งเป็นช่องเล็กๆอีก 5 ช่อง
Swab ก่อนพ่น
control
T
B
พ่นระยะห่าง 15 cm เป็นเวลา 3-5 วินาที
0 min
5 min
60 min
300 min
720 min
0 min
5 min
60 min
300 min
720 min
0 min
5 min
60 min
300 min
720 min
Control (ไม่พ่นยา)
T (พ่นยา)
B (พ่นยา)
ต่อ



นำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37^{O}c
เป็นเวลา 24-48 hrs.

ตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ *E.coli* และ Coliform ด้วยวิธี MPN

ภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการเก็บตัวอย่างจากสุกรมีชีวิต



ภาพที่ 3 แสดงวิธีการวิเคราะห์หา *E.coli* และ Coliform