วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

การเก็บตัวอย่างน้ำและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อนำมาวิเคราะห์หาเชื้อ*Salmonella*spp. และเชื้อ *E. coli*จากฟาร์มไก่เนื้อ ณ วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีเพชรบุรี

1.อุปกรณ์

1.1.อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างน้ำ

1.1.1	ขวดแก้วขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด	21	ขวด
1.1.2	ปิเปต ขนาด25 มิลลิลิตร	1	อัน
1.1.3	Pipette Controller(FastPette)	1	อัน

1.2 อุปกรณ์ในการเพาะเชื้อ

1.2.1	จานเพาะเชื้อ	100	อัน
1.2.2	ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร	5	อัน
1.2.3	ปิเปต ขนาด 0.5 มิลลิลิตร	2	อัน
1.2.4	ปิเปต ขนาด 10 มิลลิลิตร	5	อัน
1.2.5	ลูกยาง	5	อัน
1.2.6	ขวดปริมาตร ขนาด 250 มิลลิลิตร	21	ขวด
1.2.7	หลอดทดลอง ขนาด 10 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด	250	หลอด
1.2.8	หลอดทดลอง ขนาด 20 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด	300	หลอด
1.2.9	ที่วางหลอดทดลอง ขนาด 10 มิลลิลิตร	4	อัน
1.2.10	ที่วางหลอดทดลอง ขนาด 20 มิลลิลิตร	2	อัน
1.2.11	หลอดดักก๊าซ	1,000	อัน
1.2.12	ตะเกียงแอลกอฮอลล์	1	อัน
1.2.13	Loopสำหรับเขี่ยเชื้อ	5	อัน
1.2.14	บีกเกอร์ ขนาด 2,000 มิลลิลิตร	4	อัน
1.2.15	บีกเกอร์ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร	5	อัน
1.2.16	บีกเกอร์ ขนาด 800 มิลลิลิตร	2	อัน
1.2.17	บีกเกอร์ ขนาด 600 มิลลิลิตร	3	อัน
1.2.18	แท่งแก้ว	5	อัน
1.2.19	กระบอกตวง ขนาด 2,000 มิลลิลิตร	1	อัน

1.2.20	กระบอกตวง ขนาด 1,000 มิลลิลิตร	1	อัน
1.2.21	กระบอกตวง ขนาด 500 มิลลิลิตร	1	อัน
1.2.22	กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร	1	อัน
1.2.23	กระบอกตวง ขนาด 50 มิลลิลิตร	1	อัน
1.2.24	กระบอกตวง ขนาด 25 มิลลิลิตร	1	อัน
1.2.25	กระบอกตวง ขนาด 10 มิลลิลิตร	1	อัน
1.2.26	ช้อนตักสาร	4	อัน
1.2.27	อาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered Peptone Water (BPW)	1	ขวด
1.2.28	อาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport-Vassiliadis (RV) Enrichment Broth	1	ขวด
1.2.29	อาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD)	1	ขวด
1.2.30	อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Agar (BGA)	1	ขวด
1.2.31	อาหารเลี้ยงชื้อ Triple Sugar Agar(TSI)	1	ขวด
1.2.32	อาหารเลี้ยงเชื้อMotile Indole Lysine medium(MIL)	1	ขวด
1.2.33	อาหารเลี้ยงเชื้อ Urea Agar	1	ขวด
1.2.34	อาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Trytone Broth (LTB)		
	1.2.34.1 Double Lauryl Trytone Broth (DLTB)	1	ขวด
	1.2.34.2 Single Lauryl Trytone Broth (SLTB)	1	ขวด
1.2.35	อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Bile Lactose Broth (BGB)	1	ขวด
1.2.36	อาหารเลี้ยงเชื้อ EC-medium	1	ขวด
1.2.37	อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar(EMB)	1	ขวด
1.2.38	อาหารเลี้ยงเชื้อ Indole-medium	1	ขวด
1.2.40	อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)	1	ขวด
1.2.41	อาหารเลี้ยงเชื้อ Simmons Citrate Agar	1	ขวด
1.2.42	อาหารเลี้ยงเชื้อ MR-VP medium	1	ขวด
1.2.43	ตู้เขี่ยเชื้อ	1	ตู้
1.2.44	ตู้อบลมร้อน	1	ตู้
1.2.45	ตู้บ่มเชื้อ	1	ตู้
1.2.46	ตู้แช่เย็น	1	ตู้

1.2.47	หม้อนึ่งไอน้ำ		1	เครื่อง
1.2.48	เครื่องชั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง		1	เครื่อง
1.2.49	เตาให้ความร้อน		2	เครื่อง
1.2.50	Kovac's Reagent(solution)		1	ขวด
1.2.51	Methyl red Reagent(solution)		1	ขวด
1.2.52	Voges-Proskauer solution		2	ขวด
	1.2.52.1 Alpha-naphal	5%		
	1.2.52.2 Potassium Hydroxide (KOH)	40%		

2. วิธีการทดลอง

2.1 <u>การเตรียมอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างน้ำ</u>

2.1.1นำขวดแก้วขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 21 ขวด พร้อมฝาปิด และปิเปต ขนาด 25 มิลลิลิตร นำมาทำความสะอาด ใส่ถุง มัดปากถุงให้แน่น แล้วฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งไอน้ำ ตั้งอุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.1.2 นำขวดแก้วและปิเปต ออกมาใส่ในตะกร้า เพื่อเตรียมสำหรับนำไปเก็บตัวอย่างน้ำ ณ ฟาร์มวิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีเพชรบุรี

2.2 <u>ขั้นตอนการเก็บน้ำตัวอย่าง</u>

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากกระปุกน้ำที่ใช้เลี้ยงภายในโรงเรือนจำนวน 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 ถัง เก็บรวมกันใส่ขวดเดียวกัน การเก็บตัวอย่างน้ำจะใช้ปิเปตดูดตัวอย่างน้ำ แล้วนำเก็บใส่ขวดพร้อมกับปิดฝาและนำใส่ในถุงพลาสติก เก็บอีก1 ตัวอย่าง คือ บ่อพักน้ำบริเวณข้างโรงเรือนทำการเก็บทั้งหมดจำนวน 3 ซ้ำ

2.3 <u>การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการตรวจเชื้อ *Salmonella*spp.

2.3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered Peptone Water (BPW)

1) ชั่งอาหาร BPW ปริมาณ42 กรัม

2) เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร

3) นำใส่บีกเกอร์ ใช้แท่งแก้วคนจนอาหารละลายรวมกับน้ำ

4) นำอาหารเทใส่ในขวดปริมาตร (Duran)ปริมาณ 100 มิลลิลิตร

5) นำไปใส่ในหม้อนึ่งอบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6) อบเสร็จนำออกมาพักให้เย็นลง และนำเก็บใส่ไว้ในตู้แช่เย็น

2.3.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport-Vassiliadis (RV) Enrichment Broth

1) ชั่งอาหาร RV-broth ปริมาณ 10.33 กรัม

2) เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร

3) นำใส่บีกเกอร์ ใช้แท่งแก้วคนจนอาหารละลายรวมกับน้ำ

4) ใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในหลอดทดลองจำนวน 21 หลอด ปิดฝาบนหลอดทดลอง

5) นำไปใส่ในหม้อนึ่งอบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6) อบเสร็จนำออกมาพักให้เย็นลง และนำเก็บใส่ไว้ในตู้แช่เย็น

2.3.3การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD)

1) ชั่งอาหาร XLD ปริมาณ 56.68 กรัม

2) เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

3) นำใส่บีกเกอร์ ต้มบนเตาให้ความร้อน และใช้แท่งแก้วคนจนอาหารละลายรวมกับน้ำ (ต้มจนพอเดือด)

4) นำอาหารเทใส่ในขวดปริมาตร (Duran)

5) นำไปใส่ในหม้อนึ่งอบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6) อบเสร็จนำออกมาพักให้พออุ่น นำเทลงจานเพาะเชื้อ เทจนอาหารเลี้ยงเชื้อหมด โดยทำในตู้เขี่ยเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อน

7) ทิ้งไว้จนอาหารเย็นตัวจนแข็ง นำใส่ถุงพลาสติก แล้วแช่ในตู้แช่เย็น

2.3.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Agar (BGA)

1) ชั่งอาหาร BGAปริมาณ 51.00 กรัม

2) เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

3) นำใส่บีกเกอร์ ต้มบนเตาให้ความร้อน และใช้แท่งแก้วคนจนอาหารละลายรวมกับน้ำ (ต้มจนพอเดือด)

4) นำอาหารเทใส่ในขวดปริมาตร (Duran)

5) นำไปใส่ในหม้อนึ่งอบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6) อบเสร็จนำออกมาพักให้พออุ่น นำเทลงจานเพาะเชื้อ เทจนอาหารเลี้ยงเชื้อหมด โดยทำในตู้เขี่ยเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อน

7) ทิ้งไว้จนอาหารเย็นตัวจนแข็ง นำใส่ถุงพลาสติก แล้วแช่ในตู้แช่เย็น

2.3.5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Triple Sugar Agar (TSI)

1) ชั่งอาหาร TSI ปริมาณ 13.63 กรัม

2) เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร

3) นำใส่บีกเกอร์ ต้มบนเตาให้ความร้อน และใช้แท่งแก้วคนจนอาหารละลายรวมกับน้ำ (ต้มจนพอเดือด)

4) ใช้ปิเปตดูอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในหลอดทดลองจำนวน 21 หลอดปิดฝาบนหลอดทดลอง

5) นำไปใส่ในหม้อนึ่งอบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6) อบเสร็จนำออกมาพักให้พออุ่น นำหลอดมาเอียงเพื่อทำ Slant

7) ทิ้งไว้จนอาหารเย็นตัวจนแข็ง นำใส่ที่วางหลอดทดลองแล้วใส่ตู้แช่เย็น

2.3.6 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MIL-medium

1) ชั่งอาหาร MIL ปริมาณ 7.67 กรัม

2) เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร

3) นำใส่บีกเกอร์ ต้มบนเตาให้ความร้อน และใช้แท่งแก้วคนจนอาหารละลายรวมกับน้ำ (ต้มจนพอเดือด)

4) ใช้ปิเปตดูอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในหลอดทดลองจำนวน 21 หลอด และปิดฝาบนหลอดทดลอง

5) นำไปใส่ในหม้อนึ่งอบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6) ทิ้งไว้จนอาหารเย็นตัวจนแข็ง นำใส่ที่วางหลอดทดลองแล้วใส่ตู้แช่เย็น

2.3.7การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Urea Agar

1) ชั่งอาหาร

- Yeast Extract	ปริมาณ 0.025	กรัม
- Drextose (D-glucose)	ปริมาณ 0.250	กรัม
- Monopotassium Phosphate	ปริมาณ 2.275	กรัม
- Dipotassium Phosphate	ปริมาณ 2.375	กรัม

- Phenol Red ปริมาณ 0.0025 กรัม
- Agar ปริมาณ 3 กรัม
- Urea ปริมาณ 5 กรัม

2) เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร

3) นำใส่บีกเกอร์ ต้มบนเตาให้ความร้อน และใช้แท่งแก้วคนจนอาหารละลายรวมกับน้ำ (ต้มจนพอเดือด)

4) ใช้ปิเปตดูอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในหลอดทดลองจำนวน 21 หลอด และปิดฝาบนหลอดทดลอง

5) นำไปใส่ในหม้อนึ่งอบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6) อบเสร็จนำออกมาพักให้พออุ่น นำหลอดมาเอียงเพื่อทำ Slant

7) ทิ้งไว้จนอาหารเย็นตัวจนแข็ง นำใส่ที่วางหลอดทดลองแล้วใส่ตู้แช่เย็น

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการตรวจเชื้อ *E. coli*

2.3.8การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Trytone Broth (LTB)

1) ชั่งอาหาร

- Double Lauryl Trytone Broth (DLTB) ปริมาณ 53.40 กรัม
- Single Lauryl Trytone Broth (SLTB) ปริมาณ 26.70 กรัม

2) เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร(DLTB) และ 1,500 มิลลิลิตร (SLTB)

3) นำใส่บีกเกอร์ ใช้แท่งแก้วคนจนอาหารละลายรวมกับน้ำ

4) ใช้ปิเปตดูอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในหลอดทดลอง

- ขนาด 10 มิลลิลิตรจำนวน 150 หลอด
- ขนาด 20 มิลลิลิตร จำนวน 75 หลอด พร้อมปิดฝา

5) นำหลอดดักก๊าซใส่ลงในหลอดทดลอง

6) นำไปใส่ในหม้อนึ่งอบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7) อบเสร็จนำออกมาพักให้เย็นลง และนำเก็บใส่ไว้ในตู้แช่เย็น

2.3.9การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Bile Lactose Broth (BGB)

1) ชั่งอาหาร BGB ปริมาณ 7.67 กรัม

2) เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

3) นำใส่บีกเกอร์ ใช้แท่งแก้วคนจนอาหารละลายรวมกับน้ำ

4) ใช้ปิเปตดูอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในหลอดทดลองจำนวน 100หลอด และปิดฝาบนหลอดทดลอง

5) นำไปใส่ในหม้อนึ่งอบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6) ทิ้งไว้จนอาหารเย็นตัวจนแข็ง นำใส่ที่วางหลอดทดลองแล้วใส่ตู้แช่เย็น

2.3.10การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ EC-medium

1) ชั่งอาหาร ECปริมาณ 37.00 กรัม

2) เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

3) นำใส่บีกเกอร์ ใช้แท่งแก้วคนจนอาหารละลายรวมกับน้ำ

4) ใช้ปิเปตดูอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในหลอดทดลองจำนวน 100 หลอด และปิดฝาบนหลอดทดลอง

5) นำไปใส่ในหม้อนึ่งอบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6) ทิ้งไว้จนอาหารเย็นตัวจนแข็ง นำใส่ที่วางหลอดทดลองแล้วใส่ตู้แช่เย็น

2.3.11การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar (EMB)

1) ชั่งอาหาร EMB ปริมาณ 37.50 กรัม

2) เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

3) นำใส่บีกเกอร์ ต้มบนเตาให้ความร้อน และใช้แท่งแก้วคนจนอาหารละลายรวมกับน้ำ (ต้มจนพอเดือด)

4) นำอาหารเทใส่ในขวดปริมาตร (Duran)

5) นำไปใส่ในหม้อนึ่งอบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6) อบเสร็จนำออกมาพักให้พออุ่น นำเทลงจานเพาะเชื้อ เทจนอาหารเลี้ยงเชื้อหมด โดยทำในตู้เขี่ยเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อน

7) ทิ้งไว้จนอาหารเย็นตัวจนแข็ง นำใส่ถุงพลาสติก แล้วแช่ในตู้แช่เย็น

2.3.12การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Indole-medium

1) ชั่งอาหาร

- Trytone ปริมาณ 10.00 กรัม
- NaCl ปริมาณ 5.0 กรัม

2) เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

3) นำใส่บีกเกอร์ ใช้แท่งแก้วคนจนอาหารละลายรวมกับน้ำ

4) ใช้ปิเปตดูอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในหลอดทดลองจำนวน 100 หลอด และปิดฝาบนหลอดทดลอง

5) นำไปใส่ในหม้อนึ่งอบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6) ทิ้งไว้จนอาหารเย็นตัวจนแข็ง นำใส่ที่วางหลอดทดลองแล้วใส่ตู้แช่เย็น

2.3.13การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Simmons Citrate Agar

1) ชั่งอาหาร Citrate ปริมาณ 2.43กรัม

2) เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร

3) นำใส่บีกเกอร์ ต้มบนเตาให้ความร้อน และใช้แท่งแก้วคนจนอาหารละลายรวมกับน้ำ

4) ใช้ปิเปตดูอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในหลอดทดลองจำนวน 10หลอด และปิดฝาบนหลอดทดลอง

5) นำไปใส่ในหม้อนึ่งอบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6) ทิ้งไว้จนอาหารเย็นตัวจนแข็ง นำใส่ที่วางหลอดทดลองแล้วใส่ตู้แช่เย็น

2.3.14การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)

1) ชั่งอาหาร NAปริมาณ 2.80 กรัม และเติมน้ำกลั่น 1 ลิตร

2) นำใส่บีกเกอร์ ต้มบนเตาให้ความร้อน และใช้แท่งแก้วคนจนอาหารละลายรวมกับน้ำ

3) นำอาหารเทใส่ในขวดปริมาตร (Duran)

4) นำไปใส่ในหม้อนึ่งอบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5) อบเสร็จนำออกมาพักให้พออุ่น นำเทลงจานเพาะเชื้อ เทจนอาหารเลี้ยงเชื้อหมด โดยทำในตู้เขี่ยเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อน

6) ทิ้งไว้จนอาหารเย็นตัวจนแข็ง นำใส่ถุงพลาสติก แล้วแช่ในตู้แช่เย็น

2.3.15การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MR-VP Medium

1) ชั่งอาหาร

- Buffered Peptone ปริมาณ 7.00 กรัม
- Dipotassium Phosphate ปริมาณ 5.00 กรัม

- Dextose (D-glucose) ปริมาณ 5.00 กรัม

2) เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

3) นำใส่บีกเกอร์ ใช้แท่งแก้วคนจนอาหารละลายรวมกับน้ำ

4) ใช้ปิเปตดูอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในหลอดทดลองจำนวน 100 หลอด และปิดฝาบนหลอดทดลอง

5) นำไปใส่ในหม้อนึ่งอบไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

6) ทิ้งไว้จนอาหารเย็นตัวจนแข็ง นำใส่ที่วางหลอดทดลองแล้วใส่ตู้แช่เย็น

การทดลองที่ 1การตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella*spp.ในน้ำกินที่ใช้เลี้ยงในโรงเรือนไก่เนื้อ ณ วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีเพชรบุรี

1.อุปกรณ์

1.1	ขวดแก้วเก็บตัวอย่าง	21	ขวด
1.2	ปิเปต ขนาด 25 มิลลิลิตร	1	อัน
1.3	ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร	1	อัน
1.4	ปิเปต ขนาด 0.5 มิลลิลิตร	1	อัน
1.5	Pipette Controller(FastPette)	1	อัน
1.6	ลูกยาง	1	อัน
1.7	ขวดปริมาตร (Duran)	21	ขวด
1.8	Kovac's Reagent	1	ขวด
1.9	ที่เขี่ยเชื้อ	5	อัน
1.10	อาหารเลี้ยงเชื้อ Buffered Peptone Water (BPW)	1	ขวด
1.11	อาหารเลี้ยงเชื้อ Rappaport-Vassiliadis (RV) Enrichment Broth	1	ขวด
1.12	อาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD)	1	ขวด
1.13	อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Agar (BGA)	1	ขวด
1.14	อาหารเลี้ยงเชื้อ Triple Sugar Agar (TSI)	1	ขวด
1.15	อาหารเลี้ยงเชื้อ MIL-medium	1	ขวด
1.16	อาหารเลี้ยงเชื้อ Urea Agar	1	ขวด

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

2.1.1ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างน้ำ จากประปุกน้ำที่ใช้เลี้ยง เก็บทั้ง 2 ถัง รวมกันปริมาณ 50 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วปิดฝาให้แน่น และใส่ถุงพลาสติกมัดให้แน่นทั้งหมด 20 อย่าง และหนึ่งตัวอย่างเก็บจากบ่อพักน้ำจากบริเวณด้านข้างโรงเรือนเลี้ยงไก่เนื้อ

2.1.2 นำตัวอย่างน้ำมาถ่ายเชื้อลงในขวดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ BPWใส่ขวดละ 1 มิลลิลิตร จนครบเขย่า 1-2 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.1.3 นำ BPW ที่ผ่านการบ่ม ถ่ายเชื้อจาก BPW ลงใน RV-broth ปริมาตร 0.1 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.2 การเพาะแยกเชื้อ *Salmonella* spp.

2.2.1ใช้ loop ถ่ายเชื้อจาก RV-broth นำมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD และ BGA เมื่อทำจนครบแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.2.2นำอาหารเลี้ยงเชื้อออกมาตรวจดูลักษณะของโคโลนี

2.2.2.1ลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD จะมีรูปร่างกลม ขนาด 1-2 มิลลิเมตร โคโลนีที่เกิดขึ้นจะมีสีแดง และมีจุดสีดำอยู่ตรงกลาง ขอบเรียบ

2.2.2.2ลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BGA จะมีรูปร่างกลม โคโลนีที่เกิดขึ้นจะมีสีชมพูขาวทึบแสง และขอบเรียบ

2.2.3เมื่อตรวจดูแล้วว่ามีลักษณะของโคโลนีดังกล่าว ใช้ loop เขี่ยเชื้อมาอย่างน้อย 5 โคโลนี จาก XLD และ BGA มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochem test)

2.3 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Salmonella* spp.

2.3.1 Triple sugar Iron Agar (TSI) นำ loop ที่เขี่ยเชื้อจาก XLD และ BGA ทำการ streak บน slant mediaนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง บ่มเสร็จอ่านผล

2.3.2 Motile Indole Lysine medium (MIL)นำ loop ที่เขี่ยเชื้อจาก XLD และ BGA ทำการ stab ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงบ่มเสร็จนำมาอ่านผล

2.3.3Urea test นำ loop ที่เขี่ยเชื้อจาก XLD และ BGA ทำการขีดบน slantmedia บ่มที่อุณหภูมิ37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงบ่มเสร็จนำมาอ่านผล

การทดลองที่ 2การตรวจหาการปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในน้ำกินที่ใช้เลี้ยงในโรงเรือนไก่เนื้อณ วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีเพชรบุรี

1. อุปกรณ์

1.1	ขวดแก้วเก็บตัวอย่าง	21	ขวด
1.2	ปิเปต ขนาด 25 มิลลิลิตร	1	อัน
1.3	ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร	1	อัน
1.4	ปิเปต ขนาด 0.5 มิลลิลิตร	1	อัน
1.5	Pipette Controller(FastPette)	1	อัน
1.6	ลูกยาง	1	อัน
1.7	หลอดทดลอง	225	หลอด
	1.7.1 ขนาด 10 มิลลิลิตร	150	หลอด
	1.7.2 ขนาด 20 มิลลิลิตร	75	หลอด
1.8	หลอดดักก๊าซ	1,000	หลอด
1.9	ที่เขี่ยเชื้อ	5	อัน
1.9	ที่วางหลอดทดลอง		
1.10	อาหารเลี้ยงเชื้อ Lauryl Trytone Broth (LTB)	1	ขวด
	1.10.1 Double Lauryl Trytone Broth (DLTB)		
	1.10.2 Single Lauryl Trytone Broth (SLTB)		
1.11	อาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Bile Lactose Broth (BGB)	1	ขวด
1.12	อาหารเลี้ยงเชื้อ EC-medium	1	ขวด
1.13	อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin Methylene Blue Agar (EMB)	1	ขวด
1.14	อาหารเลี้ยงเชื้อ Indole-medium	1	ขวด
1.15	อาหารเลี้ยงเชื้อ Simmons Citrate Agar	1	ขวด
1.16	อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)	1	ขวด
1.17	อาหารเลี้ยงเชื้อ MR-VP medium	1	ขวด
1.18	Kovac's Reagent	1	ขวด
1.19	Methyl red Reagent	1	ขวด

1.20	Voges-Proskauer solution	2	ขวด
	1.20.1 Alpha-naphal	5%	
	1.20.2 Potassium Hydroxide (KOH)	40%	

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

2.1.1 นำตัวอย่างมาตรวจหาปริมาณเชื้อด้วยวิธี MPN อย่างละ 5 หลอด โดยทำการเจือจางตัวอย่างน้ำที่ระดับ10 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตรและ 0.1 มิลลิลิตรโดยดูดตัวอย่างที่ 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด 20 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ DLTB 10 มิลลิลิตรมีหลอดดักก๊าซอยู่ภายใน และดูดตัวอย่าง1 มิลลิลิตรกับ 0.1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ SLTB 10 มิลลิลิตรมีหลอดดักก๊าซอยู่ภายใน

2.1.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อและนับจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซนำไปอ่านค่าในตารางดัชนี MPN

2.1.3 นำหลอดที่เกิดก๊าซ มาถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC-medium และ BGB มีหลอดดักก๊าซอยู่ภายใน การถ่ายเชื้อจะใช้ loop ในการถ่ายเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.1.4 สังเกตการเจริญของเชื้อและนับจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซนำไปอ่านค่าในตารางดัชนี MPN (EC-medium อ่านผลได้เป็น Fecal coliform Bacteria และ BGB อ่านผลได้เป็น Coliform bacteria)

2.1.5 นำหลอดที่เกิดก๊าซจากอาหารเลี้ยงเชื้อ EC-medium มาถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB โดยวิธีการ streak จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.2 การเพาะแยกเชื้อ*E. coli*

2.2.1 ตรวจหาลักษณะของโคโลนีของเชื้อ *E. coli*บน EMBโดยจะมีรูปร่างกลม มีสีเขียวปีกแมลงทับ (Metallic sheen)

2.2.2ใช้ loop เขี่ยเชื้อจาก EMB ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Indole-medium และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หยด Kovac's Reagent จำนวน 5 หยด เขย่าให้เข้ากัน อ่านผล เกิดสีชมพูให้ผลบวก เกิดสีเหลืองให้ผลลบ

2.2.3ใช้ loop เขี่ยเชื้อจาก EMB ใส่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NAและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำโคโลนีที่ได้นำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochem test)

2.3การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ*E. coli*

2.3.1 Citrate test นำโคโลนีใส่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ถ้าใช้เชื้อ E. coli จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน เกิดสีเขียวเป็นผลลบ แต่ถ้าเกิดสีน้ำเงินเป็นผลบวก

2.3.2 Methyl red test นำโคโลนีใส่ลงใน MR-VP test medium broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หยด Methyl red จำนวน 5 หยด ถ้าเกิดสีแดงเป็นผลบวก แต่ถ้าเกิดสีเหลืองเป็นผลลบ

2.3.3 Voges prokauer test นำโคโลนีใส่ใน MR-VP test medium broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หยด 5% Alpha-naphal จำนวน 12 หยด และ 40% KOH จำนวน 4 หยด จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เกิดเป็นสีแดงเป็นผลบวก ถ้าไม่เกิดสีแดงให้ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จึงจะรายงานว่าเป็นผลลบ

3.การบันทึกข้อมูล

3.1 การตรวจหาเชื้อ *Salmonella*spp.

3.1.1 บ่มครบ 24 ชั่วโมง ทำการตรวจหาลักษณะของโคโลนีที่เกิดขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD และ BGA ถ้าพบลักษณะโคโลนีของ *Salmonella*spp.ทำการจดบันทึก

3.1.2 บ่มครบ 24 ชั่วโมง นำมาตรวจหาคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochem test)สังเกตจากสีที่เกิดขึ้นบน slant media ของ TSI, MIL และ Urea test ทำการจดบันทึก

<u>การอ่านผลจาก Urea test</u>

โดยดูผลจากการเกิดการเปลี่ยนที่ของ Phenol red จากสีแดงเป็นชมพู แสดงว่าเกิดการย่อยยูเรียให้แอมโมเนียซึ่งจะทำให้ค่าความเป็นกรดและเบสเพิ่มขึ้น

3.2 การตรวจหาเชื้อ *E. coli*

3.2.1 การหาค่า MPN ตรวจจากการเกิดก๊าซในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ LTB ที่ระดับการเจือจาง10, 1 และ 0.1 มิลลิลิตร โดยการนับจำนวนหลอดทดลองที่เกิดก๊าซ บันทึกและนำค่าที่ได้ไปเปิดตารางค่าดัชนี MPN

3.2.2 การหาค่า MPN ตรวจจากการเกิดก๊าซในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ EC และ BGB โดยการนับจำนวนหลอดทดลองที่เกิดก๊าซ บันทึกและนำค่าที่ได้ไปเปิดตารางค่าดัชนี MPN

3.2.3 บ่มครบ 24 ชั่วโมง ทำการตรวจหาลักษณะของโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB ถ้าพบลักษณะโคโลนีของ *E. coli*ทำการจดบันทึก

3.3 การอ่านผลการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ *E. coli*

3.3.1 ให้ผลบวกใน Indole test

3.3.2 ให้ผลบวกใน Methyl red test

3.3.3 ให้ผลลบใน Voges prokauer test

3.3.4 ให้ผลลบใน Citrate test

ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ศึกษาเฉพาะฟาร์มเลี้ยงไก่เนื้อแห่งเดียว คือ ฟาร์มวิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีเพชรบุรี อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี เพื่อประเมินทางจุลชีววิทยาของน้ำกินในฟาร์มเลี้ยงไก่เนื้อตลอดช่วงการผลิตตั้งแต่นำลูกไก่เข้าฟาร์มจนกระทั่งจับไก่ขาย และศึกษาแบคทีเรียตัวชี้วัดในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ เชื้อ*Salmonella* spp. และเชื้อ*E. coli*เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน

สถานที่ดำเนินงานวิจัย ทดลอง และเก็บข้อมูล

หน่วยวิจัยโภชนเภสัชภัณฑ์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการสัตวแพทย์ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตรมหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

ห้องปฏิบัติการจุลชีวิทยา คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตรมหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี

นิยามคำศัพท์

ในการวิจัยครั้งนี้กำหนดความหมายของคำศัพท์ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

<u>เชื้อจุลินทรีย์</u> หมายถึง เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด เชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียและฟีคัลโคลิฟอร์ม คือ *E. coli*

<u>วันที่ทำการทดลอง</u> คือ วันที่ 21 มีนาคม – 25 เมษายน พ.ศ. 2554

<u>A</u>หมายถึง เกิดปฏิกิริยา carboxydrate fermentation โดยจุลินทรีย์ที่เป็น glucose-only fermenter จะหมักย่อยกลูโคสให้เป็นกรดซึ่งจะเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลือง

<u>K</u>หมายถึง เกิดปฏิกิริยา oxidative decarboxylation และ/หรือ oxidative deamination โดยจุลินทรีย์จะย่อยกรดอะมิโน ทำให้เกิดเบสซึ่งจะทำให้สีของอาหารเปลี่ยนเป็นสีแดง ที่บริเวณ slant แต่ปริมาณเบสที่สร้างขึ้นจะไม่มากพอที่จะเปลี่ยนสีอาหารด้านล่าง (butt) ที่มีการย่อยกลูโคสให้เกิดกรดที่เปลี่ยนสีอาหารเป็นสีเหลืองให้กลับมาเป็นสีแดงได้ บริเวณด้านล่างของหลอดจึงยังคงเป็นสีเหลืองปฏิกิริยาจะเกิดอย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 18-24 ชั่วโมง

Gหมายถึง การสร้างแก๊สจากการหมักย่อยน้ำตาลได้ทุกชนิดในอาหาร (รวมทั้งแลคโตสซึ่งจะถูกย่อยเป็นกลูโคสก่อนเข้าสู่กระบวนการไกลโคไลซิส) ทำให้เกิดรอยแยกของวุ้น เช่น *E. coli* เป็น gas-producer

H_2Sหมายถึง เป็นการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์จากการรีดิวซ์ thiosulfate หรือ cysteine ในเปปโตน แล้วทำปฏิกิริยากับ ferrous sulfate ได้ตะกอนคงตัวสีดำ (black precipitate) ถ้าตะกอนสีดำปกคลุมสีอาหารที่ก้นหลอด ให้สังเกตสีอาหารที่ slant

Lysine decarboxylationหมายถึง ปฏิกิริยาดึงคาร์บอนไดออกไซด์จาก lysine ด้วยเอนไซม์ lysine decarboxylase ได้สาร cadaverine ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเบส ทำให้กรดที่ผลิตจากการหมักย่อยกลูโคสถูกทำให้เป็นกลาง เป็นผลให้อาหารเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีม่วง

Lysine deaminationหมายถึง เป็นปฏิกิริยาดึงหมู่อะมิโนออกจากไลซีนในสภาวะที่มีออกซิเจน กรดอะมิโนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นแอมโมเนียที่จะถูกปล่อยออกนอกเซลล์ ทำให้บริเวณที่สัมผัสกับอากาศเปลี่ยนเป็นสีแดง

กลุ่มควบคุม (Control)หมายถึง กลุ่มทดลองที่ได้มีการเลี้ยงไก่เนื้อแบบปกติ

กลุ่มที่ได้รับสารปฏิชีวนะ (Antibiotic)หมายถึง กลุ่มไก่ทดลองที่ได้รับDoxycyclinผสมในน้ำกินสำหรับเลี้ยงไก่ (Doxycyclin ทำงานโดยการยับยั้งการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย) ปริมาตรที่ใช้ 0.3 g/น้ำ 1,000 ml

กลุ่มที่ได้รับโปรไบโอติกส์ (Probiotic)หมายถึง กลุ่มไก่ทดลองที่ได้รับเชื้อโปรไบโอติกส์ชนิด*Enterococcus mundii*ปริมาตรที่ใช้ *E. mundii* 1 ml/น้ำ 1,000 ml ที่ความเข้มข้น 1.8×10^6 cfu/ml/ตัว/วัน

กลุ่มที่ได้รับพรีไบโอติกส์ (Prebiotic)หมายถึง กลุ่มไก่ทดลองที่ได้รับสารสกัดพรีไบโอติกส์จากหอมหัวใหญ่ผสมในน้ำกินสำหรับเลี้ยงไก่ปริมาตรที่ใช้ 20 ml/น้ำ 1,000 ml

กลุ่มที่ไดรับซินไบโอติกส์ (Synbiotic)หมาถึง กลุ่มไก่ทดลองที่ได้รับเชื้อโปรไบโอติกส์ชนิด*Enterococcus mundtii*และรับสารสกัดพรีไบโอติกส์จากหอมหัวใหญ่ ผสมในน้ำกินสำหรับเลี้ยงไก่ ปริมาตรที่ใช้ *E. mundii* 1 ml/น้ำ 1,000 mlที่ความเข้มข้น 1.8×10^6 cfu/ml/ตัว/วัน และสารสกัดจากหอมหัวใหญ่ 20 ml/น้ำ 1,000 ml

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย