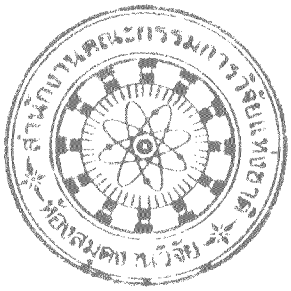


5. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

5.1 วัสดุอุปกรณ์

5.1.1 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

5.1.2 หลอดทดลอง

5.1.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์

5.1.4 ลูป (Loop)

5.1.5 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Metter รุ่น PG 802-S ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

5.1.6 ไมโครปิเปต (Micropipette) ยี่ห้อ Gilson รุ่น N21808C ประเทศฝรั่งเศส

5.1.7 สไลด์และแผ่นปิดสไลด์

5.1.8 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ยี่ห้อ Tomy autoclave รุ่น SS-325 ประเทศญี่ปุ่น

5.1.9 ตู้เพาะเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert BE400 ประเทศเยอรมนี

5.1.10 ไม้บรรทัด

5.1.11 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE400 ประเทศเยอรมนี

5.1.12 กล้องจุลทรรศน์ยี่ห้อ Olympus รุ่น CH30RE200 ประเทศเยอรมนี

5.1.13 เครื่องปั่นผสม (Votex) ยี่ห้อ Vortex-2 Genie ประเทศสหรัฐอเมริกา

5.1.14 ไม้พันสำลี

5.1.15 หัวกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

5.1.16 กระดาษกรอง Whatman filter No. 1 ยี่ห้อ Whatman Schleicher & Schuell ประเทศอังกฤษ

5.1.17 กระบอกตวง

5.1.18 บีกเกอร์

5.1.19 เครื่องกลั่นระเหยแห้ง (Rotary evaporator) ยี่ห้อ Buchi R-205/V Basic ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

5.1.20 เครื่องกรองแบบสุญญากาศ (Vacuum pump) ยี่ห้อ Thomas รุ่น DOA-V130-BN ประเทศสหรัฐอเมริกา

5.1.21 เครื่องตีผสมอาหาร (Stomacher) ยี่ห้อ AES รุ่น 03561284 ประเทศฝรั่งเศส

5.1.22 API 20E system (BioMeriexeux, Marcy l'Etoile, France)

5.1.23 API Staph system (BioMeriexeux, Marcy l'Etoile, France)

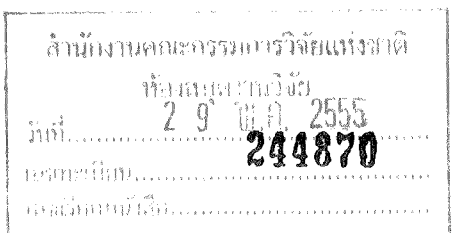
5.1.24 Laminar flow biological safety cabinet ยี่ห้อ Super Clean รุ่น 150 VC ประเทศไทย

5.2 สารเคมี

5.2.1 Gram's crystal violet solution

5.2.2 Gram's safranin O solution

5.2.3 Gram's iodine solution


สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 29 มี.ค. 2555
244870

5.2.4 Gram's alcohol solution

5.2.5 Alcohol 70% และ 95%

5.2.6 Catalase reagent

5.2.7 Oxidase reagent

5.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.3.1 Trypticase Soy Agar (TSA) ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

5.3.2 Trypticase Soy Broth (TSB) ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

5.3.3 Mueller Hinton Agar (PCA) ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

5.3.4 Plate Count Agar (PCA) ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

5.3.5 Violet Red Bile Lactose Agar (VRBA) ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

5.3.6 Bair-Parker RPE agar ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

5.3.7 Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) agar ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

5.3.8 Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

5.3.9 0.85% (w/v) Normal saline

5.3.10 0.1% (w/v) Peptone water

วิธีดำเนินการวิจัย

5.4 ศึกษาถึงการทดแทนยาฆ่าแมลงด้วยสารชีวภาพ

เมื่อทราบถึงปริมาณการปนเปื้อนของสารทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งทำให้ทราบว่าควรนำสารทดแทนประเภทใดมาทดแทนสารพิษทั้ง 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกคือ ยาฆ่าแมลง ซึ่งในปัจจุบันได้ทำการศึกษาถึงการใช้แบคทีเรียที่มีความสามารถในการฆ่าแมลงทดแทนยาฆ่าแมลงเป็นเบื้องต้น ร่วมกับการปรับสภาพทางกายภาพและเคมีและหรือการใช้สมุนไพรพื้นบ้านที่มีคุณสมบัติในการป้องกันแมลง รวมทั้งสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นสมุนไพรที่ผู้ประกอบการผลิตอาหารทะเลแห้งนิยมนำมาใช้เป็นเครื่องปรุงเพื่อเพิ่มรสชาติและความหลากหลายของผลิตภัณฑ์ โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

5.4.1 การศึกษาการใช้สารสกัดสมุนไพรพื้นบ้านที่มีฤทธิ์ป้องกันแมลงและกำจัดเชื้อก่อโรคเป็นสารทดแทนยาฆ่าแมลง

5.4.1.1 การสกัดสมุนไพร (ดัดแปลงจาก Quave et al., 2008)

นำสมุนไพรไทยชนิดต่าง ๆ เช่น สมุนไพรชนิด A สะระแหน่ ขิง กระเทียม พริก มะนาว พริกไทย ขมิ้น ใบมะกรูด ตะไคร้ เป็นต้น มาล้างน้ำทำความสะอาด หั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อน นาน 48-72 ชั่วโมง จากนั้นนำสมุนไพรมาบดให้เป็นผงละเอียดด้วยเครื่องปั่น นำผงสมุนไพรมาแช่ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุ 95% เอทานอล แล้วกรองสารสกัดสมุนไพรผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 1 ด้วยเครื่องกรองแบบสุญญากาศ (Vacuum pump) และทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง Rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

5.4.1.2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรด้วยเทคนิค Agar well diffusion assay (ดัดแปลงจาก Shan et al., 2007)

ป้าย (Swab) *S. aureus* ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งในโครงการวิจัยปีที่ 1 ที่มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 10^4 CFU/mL ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ด้วยไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ วางจานเพาะเชื้อไว้ 15 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ด้วย Metallic borer ปราศจากเชื้อ ซึ่งการเจาะหลุมจะเจาะหลุมจานเพาะเชื้อละ 3 หลุม แล้วเติมสารสกัดสมุนไพรชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในหลุมที่เจาะไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24- 48 ชั่วโมง และวัดขนาดบริเวณยับยั้งรอบหลุมเป็นมิลลิเมตร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งด้วยเทคนิค Agar well diffusion assay ใช้ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. aureus* ATCC 43300 เป็นเชื้อควบคุม

5.4.1.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของสารสกัดสมุนไพรในปลาหมึกบดแห้ง (Lin et al., 2005)

ตัดตัวอย่างอาหารทะเลแห้งขนาดกว้าง x ยาว เท่ากับ 2 x 2 เซนติเมตร แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดที่ 1 ไม่เติม *S. aureus* และไม่เติมสารสกัดสมุนไพร (ควบคุม)
ชุดที่ 2 ไม่เติม *S. aureus* แต่เติมสารสกัดสมุนไพร
ชุดที่ 3 เติม *S. aureus* และไม่เติมสารสกัดสมุนไพร
ชุดที่ 4 เติม *S. aureus* และเติมสารสกัดสมุนไพร

การเติมเชื้อให้ปิเปตแบคทีเรียทดสอบที่มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 1.0 $\times 10^4$ CFU/mL ปริมาตรละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารทะเลแห้ง จากนั้นเกลี่ยแบคทีเรียทดสอบให้ทั่วผิวหน้าของอาหารทะเล นำตัวอย่างผึ่งในตู้ Laminar flow biological safety cabinet เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมสารสกัดสมุนไพรความเข้มข้นที่เหมาะสม จากการทดลองในข้อที่ 5.4.1.2 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนตัวอย่างอาหารทะเลแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างมาผึ่งให้แห้งในตู้ Laminar flow biological safety carbinet เป็นเวลา 15 นาที ส่วนชุดควบคุมให้เติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อแทนสารสกัดสมุนไพร นำตัวอย่างอาหารทะเลแห้งแต่ละชุดการทดลองมาเก็บรักษาในถุงพลาสติก (แยกชิ้น) แล้วนำมาแช่เย็นในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยนำตัวอย่างมาตรวจนับปริมาณแบคทีเรียเป็นระยะเวลา 60 วัน ดังนี้

1. แบคทีเรียทั้งหมด (Total aerobic count) (Jeyasekaran et al., 2004)
2. โคลิฟอร์มและ *E. coli* (ดัดแปลงจาก Leclercq et al., 2002)
3. *Staphylococcus aureus* (Normanno et al., 2005)
4. *Salmonella* (Skandamis et al., 2002; Govaris et al., 2010)
5. ราและยีสต์ (BAM, 1998)
6. ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มทนเกลือ (ดัดแปลงจาก Garcia Fontan et al., 2007)

7. ปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (ดัดแปลงจาก Finney et al., 2003)

5.4.1.4 การตรวจนับปริมาณแบคทีเรีย

(1) การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (Total aerobic count)

นำตัวอย่างมาเจือจางแบบ 10 เท่า ใน 0.1% (w/v) Peptone water ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตตัวอย่างของแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผล

(2) การตรวจนับปริมาณโคลิฟอร์มและ *E. coli*

นำตัวอย่างมาเจือจางแบบ 10 เท่า ใน 0.1% (w/v) Peptone water ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตตัวอย่างของแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Violet Red Bile Lactose Agar (VRBA) ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจะมีโคโลนีสีแดงอมม่วงและมีวงขุ่นรอบโคโลนี (Presumptive coliform) จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียโคลิฟอร์มมาเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ EC broth ที่อุณหภูมิ 44±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเชื้อที่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซมาย้อมแกรมเพื่อให้แน่ใจว่าก๊าซที่เกิดขึ้นเกิดจาก *E. coli* จากนั้นยืนยันผลอีกครั้งด้วยชุดทดสอบ API 20E system (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) คำนวณปริมาณแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มและ *E. coli* โดยพิจารณาจากผลการทดสอบที่เกิดขึ้น

(3) การตรวจนับปริมาณ *Staphylococcus aureus*

นำตัวอย่างมาเจือจางแบบ 10 เท่า ใน 0.1% (w/v) Peptone water ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตตัวอย่างของแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Baird Parker RPF Agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีลักษณะเฉพาะของ *S. aureus* บนจานเพาะเชื้อ ได้แก่ โคโลนีขนาด 1.5 มิลลิเมตรหรือใหญ่กว่า ผิวเรียบ นูน ขอบเรียบ สีดำ น้ำตาลหรือสีเทาเข้ม มีวงขุ่นรอบโคโลนี และ/หรือ มีวงใสใต้วงขุ่น มาย้อมแกรมและทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลส จากนั้นยืนยันผลอีกครั้งด้วยชุดทดสอบ API Staph system (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)

(4) การตรวจนับปริมาณ *Salmonella*

นำตัวอย่างมาเจือจางแบบ 10 เท่า ใน 0.1% (w/v) Peptone water ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตตัวอย่างของแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน

24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของ *Salmonella* ที่มีลักษณะเฉพาะบนบนอาหาร XLD agar คือ มีโคโลนีสีชมพู อาจมีหรือไม่มีจุดดำตรงกลาง หรืออาจเป็นสีดำหมดทั้งโคโลนี นำเชื้อที่ได้มายืนยันผลด้วยชุดทดสอบ API 20E kit (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) และจัดจำแนกซีโรไทป์ด้วย *Salmonella* Sero-Quick ID kit

(5) การตรวจนับปริมาณราและยีสต์

นำตัวอย่างมาเจือจางแบบ 10 เท่า ใน 0.1% (w/v) Peptone water ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตตัวอย่างของแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) agar ความเจือจางละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน (ไม่ต้องคว่ำจานเพาะเชื้อ) นับจำนวนโคโลนีของราและยีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในช่วง 10-150 โคโลนี และบันทึกผลเป็น CFU/g

5.4.3 การศึกษาการใช้แบคทีเรียที่มีฤทธิ์กำจัดเชื้อก่อโรคเป็นสารทดแทนยาฆ่าแมลง

5.4.3.1 การเตรียมเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติก (Nimrat et al., 2008)

นำแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละชนิดมาขีด (Streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละชนิดมาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth (TSB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์แขวนลอยไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นแบ่งส่วนใสออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

1) ส่วนใสของเชื้อเดี่ยวมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย

2) นำส่วนใสของเชื้อเดี่ยวมาผสมกันในอัตราส่วนที่เท่ากัน เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียในรูปแบบของเชื้อผสม

5.4.3.2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคทีเรียโพรไบโอติกแบบเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมเบื้องต้น (Asha Devi et al., 2008)

ป้าย (Swab) *S. aureus* ที่มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 10^4 CFU/mL ที่ได้จากโครงการวิจัยปีที่ 1 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ด้วยไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ วางจานเพาะเชื้อไว้ 15 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ด้วย Metallic borer ปราศจากเชื้อ ซึ่งการเจาะหลุมจะเจาะหลุมจานเพาะเชื้อละ 3 หลุม จากนั้นเติมส่วนใสของแบคทีเรียโพรไบโอติกปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และวัดขนาดบริเวณยับยั้งรอบหลุมเป็นมิลลิเมตร การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งด้วยเทคนิค Agar well diffusion assay ใช้ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923 เป็นเชื้อควบคุม