

ภาคผนวก ง
วิธีวิเคราะห์คุณภาพ

การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

1. วิธีการวิเคราะห์หาความชื้น (AOAC, 1995)

อุปกรณ์

1. ตู้อบ (hot air oven)
2. ขวดชั่งหาความชื้น (weighing bottle)
3. โถดูดความชื้น (dessicator)
4. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. หาน้ำหนักที่คงที่ของขวดชั่ง โดยนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2-4 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักแล้วนำเข้าตู้อบใหม่ดำเนินการเหมือนครั้งแรก จนได้น้ำหนักคงที่
2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ใส่ลงในขวดชั่งที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว
3. เกลี่ยตัวอย่างเพื่อออกอย่างสม่ำเสมอให้มีเนื้อที่มากที่สุดเท่าที่จะทำได้
4. นำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2-4 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักแล้วนำเข้าตู้อบใหม่ ดำเนินการเหมือนครั้งแรกจนได้น้ำหนักคงที่
5. นำผลที่ได้ไปคำนวณปริมาณความชื้นดังนี้

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

2. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า (AOAC, 1995)

อุปกรณ์

1. ตู้อบ (hot air oven)
2. เตาเผาอุณหภูมิสูง (muffle furnace)
3. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (porcelain crucible)
4. โถดูดความชื้น (dessicator)
5. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ปิดสวิตช์เตาเผา แล้วรอประมาณ 30-40 นาที เพื่อให้อุณหภูมิภายในเตาตกลงก่อน แล้วนำออกจากเตาเผาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก
2. เผาซ้ำอีกครั้งละประมาณ 30 นาที โดยทำเหมือนวิธีข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้ง ติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผาอุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส และทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1-2

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา}} \times 100$$

3. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีเจลดาล (Kjeldahl flask) (AOAC, 1995)

อุปกรณ์

1. ขวดย่อยโปรตีน (Kjeldahl flask) ขนาด 250-300 มิลลิลิตร
2. ชุดกลั่นโปรตีน (semi-microdistillation apparatus)
3. ขวดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร
4. ขวดรูปหม้อ (erlenmeyer flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร
5. ปิเปตต์ (pipette) ขนาด 25 มิลลิลิตร
6. บิวเรตต์ (burette) ขนาด 25 มิลลิลิตร
7. ลูกแก้ว
8. กระดาษกรอง (filter paper)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
2. สารเร่งปฏิกิริยา ใช้คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) 1 ส่วนต่อโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 9 ส่วน
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 32 ซึ่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 32 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
4. สารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 2 ละลายกรดบอริก 20 กรัมด้วยน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร
5. สารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.1 นอร์มัล
6. อินดิเคเตอร์ใช้ fashiro indicator เตรียมเป็น stock solution ซึ่งเมทิลินบลู 0.2 กรัม ละลายในเอทานอล 200 มิลลิลิตร และซังเมธิลเรด 0.05 กรัม ละลายในเอทานอล 50 มิลลิลิตร โดยนำมาผสมในอัตราส่วน stock solution 1 ส่วน : เอทานอล 1 ส่วน : น้ำกลั่น 2 ส่วน

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 1-2 กรัม ห่อให้มิดชิด ใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 1 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตรนำไปย่อยบนเตาไฟในตู้ควั่นจนกระทั่งได้สารละลายใส ปล่อยให้เย็น
3. นำไปกลั่น โดยเติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 32 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
4. รองรับสิ่งที่กลั่นได้ด้วยสารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
5. เติมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด
6. กลั่นโดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดบอริก
7. กลั่นจนได้สารละลายในขวดจับแก๊สประมาณ 250 มิลลิลิตร
8. กลั่นประมาณ 10 นาที ล้างปลายอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่นลงในขวดรองรับ
9. ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้กับสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนได้จุดยุติเป็นสีชมพูอ่อน
10. ทำ blank ด้วยวิธีการเดียวกันตั้งแต่ข้อ 2-10

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(a-b) \times N \times 14 \times \text{factor}}{W}$$

โดยที่ a = ปริมาณของสารละลายกรดเกลือที่ใช้ในการไทเทรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

b = ปริมาณของสารละลายกรดเกลือที่ใช้ในการไทเทรต blank (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือ (นอร์มัล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

Factor = ตัวเลขที่เหมาะสม = 6.25

(น้ำหนักกรัมสมบูรณ์ของไนโตรเจนเท่ากับ 14.007)

4. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (AOAC,1995)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (Soxhlet apparatus) ประกอบด้วยบีกเกอร์สำหรับใส่ตัวทำละลายซ็อกเล็ต (soxhlet) เครื่องควบแน่น (condenser) และเตาให้ความร้อน
2. หลอดใส่ตัวอย่าง (extraction thimble)
3. สำลี
4. ตู้อบไฟฟ้า
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด
6. โถดูดความชื้น

วิธีการ

1. อบบีกเกอร์สำหรับหาไขมัน ซึ่งมีขนาดความจุ 150 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้าทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักประมาณ 1-2 กรัม ห่อให้มิดชิดแล้วใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยสำลีเพื่อให้สารละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ
3. นำหลอดตัวอย่างใส่ลงในซ็อกเล็ต (soxhlet)
4. เติมน้ำมันโพรเลียมอีเทอร์ลงในขวดหาไขมันปริมาณ 50 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตาให้ความร้อน
5. ทำการสกัดไขมันเป็นเวลา 45 นาที โดยปรับความร้อนให้หยดของสารที่ละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที
7. ระเหยจนเหลือสารละลายในขวดกลมเพียงเล็กน้อยด้วยเครื่องระเหยตัวที่ละลาย
8. นำขวดไปอบในตู้ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จนแห้ง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
9. ชั่งน้ำหนักแล้วอบซ้ำครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

5. วิธีคำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรต (อำนาจ, 2524)

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)} = & 100 - [\text{ปริมาณความชื้น(ร้อยละ)} + \text{ปริมาณโปรตีน(ร้อยละ)} \\ & + \text{ปริมาณไขมัน(ร้อยละ)} + \text{ปริมาณเถ้า(ร้อยละ)}] \end{aligned}$$

6. วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแล็กติก (AOAC, 1995)

อุปกรณ์

1. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร
2. บิวเรตต์ ขนาด 25 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. ฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein)
2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 นอร์มัล

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่าง โดยตัดตัวอย่างให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วชั่งมาประมาณ 9 กรัมใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร นำไปต้มจนเดือด เพื่อกำจัดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์
2. เติมฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์
3. นำไปไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 นอร์มัล จนได้จุดยุติ (end point) มีสีชมพูอ่อนๆ

การคำนวณ

ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละ) = ปริมาณ NaOH ที่ใช้ในการไทเทรต (ml.) X ความเข้มข้นของ NaOH (N)

7. วิธีการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์เกลือ FAO (1981)

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างอย่างละเอียดให้อยู่ระหว่าง 2 กรัม
2. สกัดเกลือจากตัวอย่าง โดยใช้น้ำกลั่นเล็กน้อยในเครื่องบดผสมเป็นเวลา 2 นาที
3. กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ลงใน volumetric flask ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรของสารละลายที่สกัดได้เป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
4. ดูดสารละลายที่สกัดได้มา 25 มิลลิลิตร ใส่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม โพแทสเซียมโครเมต (potassium chromate) เข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงไป 0.5 มิลลิลิตร แล้วไทเทรตกับ 0.1 N silver nitrate จนได้ตะกอนสีแดงอิฐ
5. ร้อยละของปริมาณเกลือสามารถคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\text{ปริมาณเกลือ (ร้อยละ)} = \frac{\text{ปริมาตรที่ใช้ไทเทรต} \times 5.8}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

8. การวิเคราะห์หาค่า Thiobarbituric acid number (TBA) (AOAC, 1995)

อุปกรณ์

1. ขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25 และ 100 มิลลิลิตร
2. ปิเปต 5 มิลลิลิตร
3. หลอดทดลองพร้อมจุกแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10–15 มิลลิเมตร
4. Glass cell ขนาด 10 มิลลิเมตร
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 95 องศาเซลเซียส
6. Spectrometer อ่านค่าความยาวคลื่นที่ 530 นาโนเมตร

สารเคมี

1. 1- butanol บริสุทธิ์มีน้ำไม่เกินร้อยละ 0.5
2. 2- Thiobarbituric acid
3. สารละลาย TBN เตรียมโดยละลาย 200 มิลลิกรัม ของ 2- Thiobarbituric acid ใน 100 มิลลิลิตร ของ 1- butanol ที่ไว้ค้างคืน หรือใช้เครื่องอัลตราโซนิก ช่วยในการละลาย จากนั้นกรองหรือเข้าเครื่องเหวี่ยงขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรโดยใช้ 1- butanol สารนี้ต้องเก็บในตู้เย็นและใช้ได้ภายใน 1 สัปดาห์

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 50 – 200 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25 มิลลิลิตร เติม 1- butanol ลงเล็กน้อย เพื่อละลายตัวอย่าง จากนั้นปรับปริมาตรที่เหลือโดยเติม 1- butanol ลงไป
2. ปิเปตตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีจุกแก้วที่แห้ง จากนั้นปิเปตสารละลาย TBA 5 มิลลิลิตร ใส่ลงไป ปิดจุกแก้ว แล้วผสมให้เข้ากันดี จากนั้นใส่ลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลา นำหลอดตัวอย่างขึ้นมาทำให้เย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง โดยการให้น้ำไหลผ่าน เพื่อลดความร้อน
4. นำสารละลายที่ได้ใส่ใน Glass cell ขนาด 10 มิลลิเมตร วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่น เป็น reference cell
5. เตรียม blank พร้อมกับตัวอย่างด้วย โดยค่าของ blank ไม่ควรเกิน 0.1

การคำนวณ

$$\text{TBN value} = \frac{50 \times (A-B)}{M}$$

A = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

B = ค่าการดูดกลืนแสงของ blank

m = มวลเป็นมิลลิกรัมของตัวอย่าง

50 = ค่าตัวแปรที่ใช้เมื่อเตรียมตัวอย่าง โดยใช้ขวดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25 มิลลิลิตร และใช้ Glass cell ขนาด 10 มิลลิเมตร

9. การวิเคราะห์หาแคลเซียม (AOAC, 1995)

อุปกรณ์

1. Crucible
2. เตาเผา 550 องศาเซลเซียส
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
4. Beaker 250 มิลลิลิตร
5. Watch glass
6. แท่งแก้ว
7. Funnel
8. Hot plate

สารเคมี

1. HCl เตรียมโดยเจือจางกรดเกลือ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น 150 มิลลิลิตร
2. สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) โดยเจือจาง NH_4OH 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
3. สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) โดยเจือจาง NH_4OH 1 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
4. สารละลายแอมโมเนียมออกซาเลต ($(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$) ร้อยละ 4.2 โดยละลาย $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ 4.2 กรัม ในขวดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร เขย่าจนละลายหมด
5. H_2SO_4
6. HNO_3
7. Methyl red เตรียมโดยละลาย Methyl red 0.5 กรัม ในเอทานอล 100 มิลลิลิตร

8. สารละลายต่างพับทิมมาตรฐาน 0.1 N (KMnO_4) โดยละลาย KMnO_4 3.2 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร ต้มให้เดือด 1 ชั่วโมง ทิ้งข้ามคืนปิดด้วย Watch Glass กรองด้วยกรวยกรอง โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 40 แล้วเก็บในขวดสีชา

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ลงใน Cucible นำไปเผาที่ 550 องศาเซลเซียส นาน 3-4 ชั่วโมง ในเตาเผาจนได้สีขาว หากแล้วยังไม่เป็นสีขาวต้องนำมาทำให้ขึ้นด้วยกรดไนตริกตั้งบน Hot plate จนแห้ง แล้วนำกลับไปเผาในเตาที่ 550 องศาเซลเซียส อีกเป็นเวลา 90 นาที หากยังไม่ขาวก็ต้องเติมกรดไนตริกอีกแล้วทำซ้ำจนได้สีขาว
2. เติม HCl 40 มิลลิลิตร โดยค่อยๆเติมทีละน้อยชะตัวอย่างจากถ้วยแก้ว และถ่ายลงใน beaker 250 มิลลิลิตร หยดกรดไนตริก 2-3 หยด
3. ต้มจนเดือดใน Hood
4. ถ่ายตัวอย่างลงในขวดแล้วปรับปริมาตร 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นแล้วเขย่าให้เข้ากัน
5. ทิ้งให้ตกตะกอนแล้วนำส่วนใสออกมา 25 มิลลิลิตร ใส่ลงใน beaker 250 มิลลิลิตร
6. ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นหยด Methyl red 1-2 หยด (พร้อมทำ blank)
7. เติม NH_4OH ทีละหยดจนได้ความเป็นกรด-เบส 5.6 ซึ่งสามารถสังเกตได้ว่าสีจะเป็นสีส้มปนน้ำตาล (หากความเป็นกรด-เบส สูงเกินไปก็ปรับด้วย HCl จนได้ความเป็นกรด-เบส ที่ต้องการ)
8. เติม HCl 2 หยด หรือจนกระทั่งสีส้มเปลี่ยนเป็นสีชมพู (ความเป็นกรด-เบส 2.5-3)
9. ปรับปริมาตรเป็น 150 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปต้มให้เดือดแล้วค่อยเติม 10 มิลลิลิตร ของสารละลายอิมตัวแอมโมเนียมออกซาลาต (4.2 %) ที่ร้อนโดยคนตลอดเวลาในขณะที่เติม
10. หากละลายเปลี่ยนสีเป็นสีส้มหรือสีเหลือง ให้เติม HCl ทีละหยดจนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีชมพูอีกครั้ง
11. ทิ้งสารละลายตัวอย่างข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้ตกตะกอนโดยปิดด้วย beaker ด้วย Watch glass

12. กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman NO. 40 และล้างตะกอนด้วย NH_4OH 10 มิลลิลิตร
13. เจาะกระดาษกรองเป็นรูด้วยแท่งแก้วชะด้วยน้ำกลั่น 125 มิลลิลิตร โดยล้างผ่านกรวยใน beaker ใบเดิม
14. เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 5 มิลลิลิตร เพื่อละลายตะกอน
15. อุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และไตเตรทด้วย 0.1 N ของ KMnO_4

ข้อระวัง

1. KMnO_4 ไวแสงมากจึงไม่ควรทิ้งไว้ใน buret นานเกินจำเป็น เพราะทำให้ end point คลาดเคลื่อนได้
2. ระหว่างการไตเตรทป้องกันไอกรดที่ระเหยจากตัวอย่าง ด้วยการใส่หน้ากากป้องกันไอกรดหรือไตเตรทใน Hood

การคำนวณ

1 มิลลิลิตร ของ 0.1 N KMnO_4 ทำปฏิกิริยาพอดีกับ 0.02004 กรัมของ Ca

$$\text{แคลเซียมร้อยละ} = \frac{(S-B) \times N \times 0.02004 \times \text{DF} \times 100}{W}$$

W

S = ปริมาตรของ Standard Potassium Permanganate ที่ไตเตรทตัวอย่าง

B = ปริมาตรของ Standard Potassium Permanganate ที่ไตเตรท blank

N = Normality KMnO_4

D.F. = Dilution Factor

W = น้ำหนักตัวอย่าง (น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้นก่อนเผา)

วิธีการเตรียม Standardization KMnO_4 0.1 N

อุปกรณ์

1. Beaker 600 มิลลิลิตร
2. Hot plate
3. แท่งแก้ว
4. Magnetic stirrer
5. Cylinder 250 มิลลิลิตร
6. Thermometer
7. บิวเรต

สารเคมี

1. $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ที่อบแล้ว 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
2. H_2SO_4 เตรียมโดยการเจือจางกรดกำมะถันเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 95 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 10-15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นอุณหภูมิประมาณ 27 ± 3 องศาเซลเซียส

วิธีการ

1. ชั่ง $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ที่อบแล้ว 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 0.3 กรัม ลงใน Beaker 600 มิลลิลิตร
2. เติม H_2SO_4 250 มิลลิลิตร
3. กวนด้วย stirrer จน $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ละลายหมด
4. เติม 40 มิลลิลิตร 0.1 N ของ KMnO_4 กวนช้าๆจนสีชมพูหายไปประมาณ 45 นาที
5. ต้มที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส นำไปไตเตรตด้วย 0.1 N KMnO_4 ที่เตรียมไว้จนกลายเป็นสีชมพู

การคำนวณ

$$\text{Normality of KMnO}_4 = \frac{\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4 \times 1000}{\text{ml.KMnO}_4 \times 66.999}$$

การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

1. วิธีการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (AOAC, 1995)

1.1 การเตรียมตัวอย่าง ทำโดยชั่งตัวอย่าง 25 กรัม โดยวิธีปราศจากเชื้อ (aseptic technique) แล้วเติมสารละลาย normal saline (เกลือร้อยละ 0.85) ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไป 225 มิลลิลิตร ปั่นตัวอย่างให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นตัวอย่าง (stomacher) จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 1:10

1.2 ใช้ Pour plate technique โดยการปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ กัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในงานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ค่อย ๆ รินอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar ลงไปให้มีปริมาตรประมาณ 18-20 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เขย่าให้ตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกัน ทำซ้ำระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ กลับงานเพาะเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง

1.3 คัดเลือกงานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี นับจำนวนด้วยเครื่องนับโคโลนี

1.4 หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้ในแต่ละระดับความเจือจางคูณด้วยค่า dilution factor ของระดับความเจือจางที่นับได้ คำนวณเป็นจำนวนโคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (CFU/กรัม)

2. วิธีการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียเล็กดึก (AOAC, 1995)

2.1 การเตรียมตัวอย่างทำเช่นเดียวกับการหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

2.2 ใช้วิธี Pour plate technique โดยการปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ กัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในงานเพาะเชื้อแล้วค่อย ๆ รินอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar เติม CaCO_3 ร้อยละ 0.5 และ bromocresol purple ร้อยละ 0.004 ลงไป ทำการเจือจางระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียครั้งละ 10 เท่า กลับงานเพาะเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-28 ชั่วโมง

2.3 นับจำนวนโคโลนีเฉพาะที่สามารถสร้างบริเวณใส (clear zone) และอาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

2.4 หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้ในแต่ละระดับความเจือจางคูณด้วยค่า dilution factor ของระดับเจือจางที่นับได้ คำนวณเป็นจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียเล็กดึกต่อตัวอย่าง 1 กรัม (CFU/กรัม)

การจำแนกแบคทีเรียแล็กติก

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบคุณสมบัติ ดังนี้

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี

ก. การตรวจสอบการติดสีแกรม

เจียเชื้อบริสุทธิ์ลงบนแผ่นสไลด์ ย้อมสีด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที เทสีทิ้งพร้อมทั้งหยดสารละลายไอโอดีนนาน 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง พร้อมทั้งหยดแอลกอฮอล์นาน 15 วินาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงย้อมสีด้วยสารละลาย safranin O เป็นเวลา 15 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจสอบลักษณะเซลล์ การจัดเรียงตัว โดยใช้กล้องจุลทรรศน์

ข. การทดสอบคะตะเลส (catalase)

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง มาเขียนบนจานเพาะเชื้อที่สะอาดแล้ว หยดสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ร้อยละ 3 ถ้าพบโคโลนีเกิดฟองอากาศ แสดงว่าแบคทีเรียนั้นให้ผลเป็นบวก ส่วนโคโลนีที่ไม่เปลี่ยนแปลงจะให้ผลลบ

ค. การตรวจสอบการสร้างแก๊ส

เจียเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ใส่หลอดดักแก๊ส บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง แบคทีเรียกลุ่ม heterofermentative bacteria จะพบแก๊สในหลอดดักแก๊ส ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม homofermentative bacteria จะไม่พบแก๊สในหลอดดักแก๊ส

ง. การเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เจียเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 10 และ 40 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญโดยดูจากความขุ่นเมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และภายใน 7 วัน

จ. การทดสอบความทนเกลือ

เจียเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 และ 18 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญโดยดูจากความขุ่นเมื่อ บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และภายใน 7 วัน

ฉ. การตรวจสอบความสามารถในการเจริญที่ระดับความเป็นกรด-เบส ต่าง ๆ

เจียเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ระดับความเป็นกรด-เบส 4.4 และ 9.6 ตามลำดับเขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญโดยดูจากความขุ่นเมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และภายใน 7 วัน

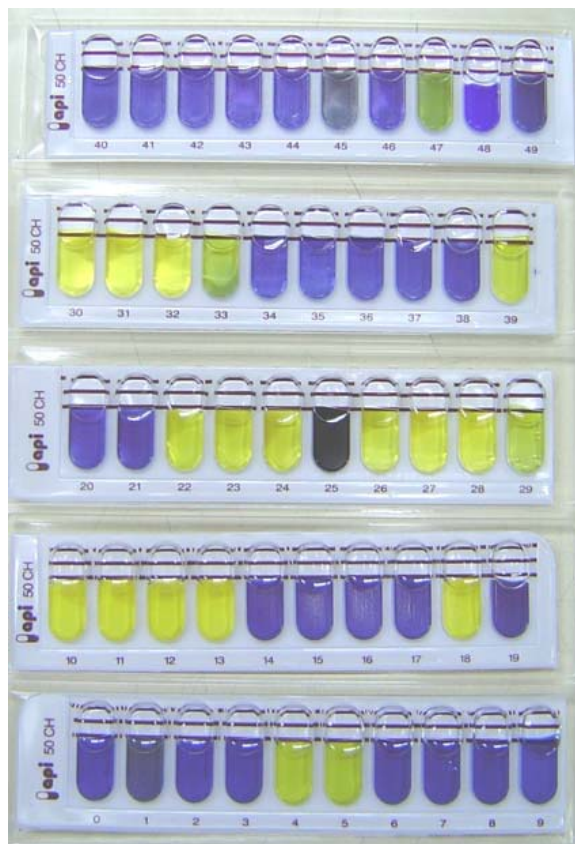
การจำแนกด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHL

ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL เพื่อใช้ศึกษาขบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ API GP medium ในการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย แล้วจึงถ่ายลงในแต่ละ microtubes บน strip ระหว่างการบ่มเชื้อจะหมักคาร์โบไฮเดรตได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดมีผลให้ ค่าความเป็นกรด-เบส ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง โดยสังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ (ภาพผนวกที่) ผลการทดสอบจะขึ้นอยู่กับรูปแบบของแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งวิธีการทดสอบทำได้โดย

เจียเชื้อ 2-3 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ API GP ปรับความขุ่นเท่ากับ 4 McFarland

ถ่ายเชื้อที่เตรียมลงในหลอดทดสอบและหยดทับด้วย mineral oil ปิดดอกเชื้อ และบ่มที่ อุณหภูมิ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส

อ่านผลหลังการบ่มที่ 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ผลบวกเกิดจากการสร้างกรดทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (การทดสอบ Esculin เป็นผลบวกเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีดำ) แล้ววิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยโปรแกรม APILAB Plus



ภาพผนวกที่ 15 การทดสอบความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด ของเชื้อ *Lactobacillus brevis* ด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHL

3. วิธีการตรวจหาหีสต์และรา (AOAC,1995)

3.1 เตรียมตัวอย่างอาหารเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

3.2 ปิเปตต์ตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ความเจือจาง 10^{-1} - 10^{-5}) ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำซ้ำความเจือจางละ 2 จาน จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar ที่ปรับ ความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 3.5 โดยใช้ tartaric acid ร้อยละ 10 ที่หลอมละลายและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัว ไม่ต้องกลับจานเพาะเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นานประมาณ 2-3 วัน

3.3 นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อ บันทึกผลแล้วคูณด้วย dilution factor ของความเจือจางที่นับจำนวนได้และหาค่าเฉลี่ยจากนั้นคำนวณเป็นโคโลนีต่อกรัมของน้ำหนักตัวอย่าง (CFU/กรัม)

4. วิธีการตรวจหา *Clostridium perfringens* (A.P.H.A., 1992)

4.1 เตรียมตัวอย่างเช่นเดียวกับการหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

4.2 ปิเปตต์ตัวอย่างที่ทำการเจือจางแล้วปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptose sulfite cycloserine egg yolk (TSC-EY) agar หรือ Shahidi ferguson perfringens (SFP) agar แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวอาหาร

4.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 34-35 องศาเซลเซียส นาน 20-24 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน (ใน anaerobic jar หรือ anaerobic incubator)

4.4 นับโคโลนีสีดำ มีบริเวณทึบแสงสีขาว (opaque white zone) นำมาทดสอบยืนยัน

4.5 ถ่ายเชื้อลง Thioglycolate broth บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

4.5.1 Stab ลง Motility nitrate medium บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง *C. perfringens* ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ดังนั้นการเจริญจะเกิดเฉพาะตามรอยแทงของลูปเท่านั้น ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ไนเตรดให้เป็นไนไตรต์ด้วยน้ำยาทดสอบ N-(1-naphthyl) ethylenediamine ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลาย Sulfanilic acid ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในหยอด ซึ่งจะให้สีแดงภายในเวลา 5 นาที ในกรณีที่การทดสอบครั้งแรกได้ผลลบ ให้บ่มหลอดเชื้ออีกหนึ่งหลอดต่ออีก 24 ชั่วโมง แล้วทดสอบซ้ำ

4.5.2 Stab ลง Lactose gelatin medium บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง *C. perfringens* สามารถเฟอร์เมนแล็กโทส เกิดฟอง และมีกรดเกิดขึ้น ทำให้อาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองและมีเอนไซม์ย่อยเจลาตินได้ ทดสอบได้โดยการแช่หลอดในน้ำแข็ง นานประมาณ 30 นาที เจลาตินที่ถูกย่อยสลายแล้วจะไม่จับตัวเป็นก้อนแข็ง

5. วิธีการตรวจหา *Salmonella* sp. (AOAC, 1995)

5.1 ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม โดยวิธี aseptic technique เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth ลงไป 225 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

5.2 ปิเปตต์ตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Selenite cystine broth (SC) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

5.3 Streak ลงบน Xylose lysine desoxycholate agar (XLD) และ Salmonella Shigella (SS) agar บ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

5.4 คุ้ลักษณะโคโลนีของ *Salmonella* sp. บน Xylose lysine desoxycholate agar

(XLD) จะใสขอบเรียบ อาจมีหรือไม่มีจุดสีดำของเหล็กซัลไฟด์ตรงกลางโคโลนีอาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนีจะไม่เปลี่ยนสี ส่วนบน SS agar โคโลนีจะไม่มีสี ใสหรือทึบ ไม่มีจุดสีดำของเหล็กซัลไฟด์ตรงกลางโคโลนี เลือกลโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

5.5 การทดสอบทางชีวเคมี โดยการถ่ายเชื้อจากโคโลนีด้วยเข็มเย็บเชื้อ ถ่ายลงใน Triple sugar iron agar (TSI) และ Lysine indole motility (LIM) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง *Salmonella* sp. บน TSI จะให้ผล slant เป็นค่าง (สีแดง) และ butt เป็นกรด (สีเหลือง) [K/A] อาจพบหรือไม่พบการสร้างแก๊สสีดำจาก H_2S ส่วนบน LIM พบว่า Lysine decarboxylase agar ส่วนใหญ่ให้ผลบวก (อาหารเลี้ยงเชื้อสีม่วงเหมือนเดิม) ยกเว้น *S. paratyphi* และการทดสอบอินโดล (indole) ให้ผลลบ (ไม่เกิดสีชมพูในชั้นของ Kovac's reagent) motility ให้ผลบวก (มีการเจริญนอกแนวที่ถ่ายเชื้อ)

5.6 นำเชื้อที่สงสัยว่าจะเป็น *Salmonella* sp. จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีมาทดสอบทางซีรั่มวิทยา (serology) โดยดูการตกตะกอน (agglutination) กับ antiserum ชนิด polyvalent ของ *Salmonella* sp.

5.7 รายงานผลว่าพบหรือไม่พบ *Salmonella* sp. ในตัวอย่าง 25 กรัม

6. วิธีการตรวจหา *Staphylococcus aureus* (AOAC, 1995)

6.1 เตรียมตัวอย่างอาหารเช่นเดียวกับการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

6.2 ปิเปตต์ตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Tryptic soy broth (TSB) เดิมเกลือ ร้อยละ บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

6.3 ปิเปตต์ตัวอย่างอาหาร 0.1 มิลลิลิตร ลงบน Mannitol salt egg yolk agar (MS-EY) หรือ Baird – Parker medium (BP agar) เกลี่ยให้ทั่วผิวอาหาร บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

6.4 สังเกตโคโลนีของ *Staphylococcus* sp. ซึ่งอยู่บน MS-EY agar โคโลนีสีขาวหรือเหลืองขนาดเล็กมีบริเวณทึบแสง (opaque zone) และบน BP agar โคโลนีมีสีดำเป็นมัน มีขอบ ตกตะกอนรอบ ๆ

6.5 ทดสอบเอนไซม์ coagulase โดยตรวจการแข็งตัว (clot) ของ coagulase plasma EDTA ทุก ๆ 1 ชั่วโมง โดยต้องเกิดการแข็งตัวภายใน 4-6 ชั่วโมง จึงถือว่าให้ผลบวก เชื้อที่ให้ผลทดสอบเอนไซม์ coagulase เป็นผลบวก จัดเป็น *Staphylococcus aureus*

7. วิธีการตรวจหา *Bacillus cereus* (A.P.H.A., 1992)

7.1 เตรียมตัวอย่างอาหารเช่นเดียวกับการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

7.2 ปิเปตต์ตัวอย่างอาหาร 0.1 มิลลิลิตร ลงบน Mannitol egg yolk polymixin (MEYP) agar หรือ *Bacillus cereus* agar เกลี่ยให้ทั่ว บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.3 นับจำนวนโคโลนีที่เป็นลักษณะของ *B. cereus* บน MEYP agar จะมีสีชมพูแดง มีโซนทึบแสงรอบ ๆ โคโลนี และอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนสี ส่วนโคโลนี *Bacillus cereus* agar จะมีสีฟ้า ขนาดประมาณ 5 มิลลิลิตร และมีโซนทึบแสงรอบ ๆ โคโลนีเช่นเดียวกัน

7.4 เลือกโคโลนีที่ทำการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี และข้อสมมติแบบแกรม

7.4.1 *B. cereus* ไม่เฟอร์เมนต้น้ำตาล xylose และไม่เฟอร์เมนต้น้ำตาล Arabinose เมื่อเลี้ยงบน Blood agar จะ hemolyze เกิดขอบบริเวณใสรอบโคโลนีและให้ผลบวกกับการทดสอบ Voges-Prokauer (VP)

7.4.2 *B. cereus* มีลักษณะเซลล์ใหญ่ติดสีแดง มีเม็ดไขมันติดสีดำของ Sudan black สปอร์ติดสีเขียวอยู่กลางเซลล์ ขนาดของสปอร์เล็กกว่าขนาดของเซลล์

8. วิธีการตรวจหาปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรีย ฟีคัล โคลิฟอร์มแบคทีเรียและ *Escherichia coli* (AOAC, 1995)

8.1 เตรียมตัวอย่างอาหารเช่นเดียวกับการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

8.2 ปิเปตต์ตัวอย่างอาหารที่ระดับความเจือจาง 1:10, 1:100 และ 1:1000 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหาร Lauryl sulfate tryptose broth (LST broth) ระดับความเจือจางละ 3 หลอด

8.3 บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

8.4 ตรวจสอบหลอดที่ให้ผลบวก โดยจะเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส (presumptive test)

8.5 ใช้ลูปถ่ายเชื้อจากหลอดที่มีแก๊สลงในอาหาร Brilliant green lactose bile broth (BGLB) และ EC broth

8.5.1 BGLB นำไปบ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนหลอดที่เกิดแก๊สทั้งหมดในขั้นนี้ (confirm test) นำไปหาค่า MPN ของโคลิฟอร์มจากตาราง MPN

8.5.2 EC broth นำไปบ่มในหม้ออ่างไอน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 44.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนหลอดที่เกิดแก๊สทั้งหมดในขั้นนี้ (confirm test) นำไปหาค่า MPN ของฟีคัล โคลิฟอร์มจากตาราง MPN

8.6 การตรวจหา *E. coli*

8.6.1 ใช้ลูปถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวกในข้อ 8.5.2 มา streak ลงบนอาหาร Eosin methylene blue (EMB) agar บ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

8.6.2 เลือกโคโลนีที่มีสีเข้มคล้ำ อาจมีเงาโลหะหรือไม่มีก็ได้ ถ่ายเชื้อลงในอาหาร NA-slant บ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

8.6.3 ทดสอบปฏิกิริยา IMViC ได้แก่

Indole production ทำโดยถ่ายเชื้อลงใน Tryptose broth บ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบการสร้างอินโดล โดยเติม Kovac's reagent 0.2-0.3 มิลลิลิตร ถ้าเกิดสีชมพูหรือสีแดงที่ผิวหน้าแสดงว่าให้ผลบวก

Methyl red reactive compounds ทำโดยถ่ายเชื้อลงใน MR-VP medium บ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารละลายเมธิลเรดลงไป 5 หยด ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่าให้ผลบวก

Voges-Proskauer reactive compounds ทำโดยถ่ายเชื้อลงใน MR-VP medium บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย α -naphthol 0.6 มิลลิลิตร และ KOH ร้อยละ 40 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ถ้ามีสีชมพูเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลบวก

Citrate utilization ถ่ายเชื้อลงในอาหาร Koser's citrate broth บ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ถ้าอาหารขุ่นแสดงว่าให้ผลบวก

8.6.4 ข้อมติแบบแกรม

8.6.5 คำนวณค่า MPN ของ *E. coli* ต่อกรัมของอาหารจากหลอดที่ทดสอบแล้วว่า มีแบคทีเรียรูปท่อน แกรมลบ และได้ผลการทดสอบ IMViC เป็น +++ หรือ +---

9. วิธีการตรวจหา *Vibrio parahaemolyticus*

9.1 เตรียมตัวอย่างอาหารเช่นเดียวกับการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด

9.2 ปิเปตต์ตัวอย่างอาหารที่ระดับความเจือจาง 1:10, 1:100 และ 1:1000 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Alkaline peptone water ความเป็นกรด-เบส 8.5 ระดับความเจือจางละ 3 หลอด

9.3 บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

9.4 ใช้ลูปถ่ายเชื้อจากหลอดมา streak ในอาหาร Thiosulfate citrate bile salts Sucrose agar (TCBS) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

9.5 อ่านผลโดยดูจากลักษณะโคโลนีของ *V. parahaemolyticus* ซึ่งมีลักษณะกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-3 มิลลิลิตร สีเขียวหรือสีน้ำตาลเงินอมเขียว นำโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวมาทดสอบทางชีวเคมี

9.5.1 ถ่ายเชื้อแบบใช้ needle เขี่ยเชื้อและแทงลงในส่วน butt และ streak ในส่วน slant ในอาหาร Triple sugar iron agar (TSI) และนำเชื้อมา stab ในอาหาร Motility indole lysine agar (MIL) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง ตรวจผล positive ในอาหาร TSI ส่วน Slant จะเป็นสีแดง และส่วน butt เป็นสีเหลืองอาหาร MIL ให้ผลบวกทั้งหมดคือ lysine decarboxylase (สีม่วงเหมือนเดิม) indole และ motility

9.5.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส โดยหยดสารละลาย oxidase test บนกระดาษกรอง ใช้ loop เขี่ยเชื้อมาขีดบนกระดาษกรอง โดยที่ *V. parahaemolyticus* ให้ผลของเอนไซม์ออกซิเดสเป็นบวก

9.5.3 ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ในอาหาร Tryptic soy broth เดิมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 นำไปที่อ่างควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 42 องศาเซลเซียส โดยที่ *V. parahaemolyticus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส โดยสังเกตได้จากความขุ่นของอาหาร

9.5.4 การทดสอบความสามารถในการทนเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ที่เดิมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0, 1, 3, 6, 8 และ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง โดยที่ *V. parahaemolyticus* สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ร้อยละ 3, 6 และ 8

9.5.5 การทดสอบ Voges-Proskauer (VP) ในอาหาร MR-VP broth บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง โดยที่ *V. parahaemolyticus* ให้ผลเป็นลบ

9.5.6 การทดสอบความสามารถในการใช้ยูเรีย (urea hydrolysis) ในอาหาร Christensen's urea agar ป้อนที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง โดยที่ *V. parahaemolyticus* สามารถใช้ยูเรียได้

9.5.7 การทดสอบความสามารถในการน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในอาหาร Bromcresol purple borth ที่มีน้ำตาลต่าง ๆ ร้อยละ 0.5 ได้แก่ sucrose, lactose, D-mannitol, mannose, arabinose และ cellobiose ป้อนที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 4-5 วัน อ่านผลทุก ๆ 24 ชั่วโมง

9.6 นับจำนวนหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Alkaline peptone water หรือ Alkaline peptone salt broth ของแต่ละความเจือจางที่พบ *V. parahaemolyticus* เปรียบเทียบกับตาราง MPN

9.7 การตรวจหา Kanagawa phenomenon โดยนำเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหาร TSB เดิม เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 เชื้อเชื้อ 1 loopfull และลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ Wagatsuma agar ป้อนที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยที่ *V. parahaemolyticus* ให้ผลเป็นบวก จากการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

ภาพผนวก จ
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Alkaline peptone water (APW)

เพปโตน (peptone)	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	10	กรัม
ค่าความเป็นกรด-เบส	8.5	

นำเพปโตนและโซเดียมคลอไรด์ผสมกับน้ำกลั่น หรือน้ำกรอง (deionized water) ปริมาตร 1 ลิตร ต้มจนละลาย ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้ได้ตามที่กำหนด และทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที

2. Brilliant green lactose bile broth (BGLB)

เพปโตน (peptone)	10	กรัม
น้ำตาลแล็กโทส (lactose)	10	กรัม
น้ำดีของวัว (oxgall)	20	กรัม
สียกรีนเลียนกรีน (brilliant green)	0.0133	กรัม
ค่าความเป็นกรด-เบส	7.2	

นำเพปโตน น้ำตาลแล็กโทส น้ำดีของวัว และสียกรีนเลียนกรีนผสมกับน้ำกลั่น (distilled water) หรือน้ำกรอง (deionized water) ปริมาตร 1 ลิตร ต้มจนละลาย ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้ได้ตามที่กำหนด และทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที

3. Man rogosa and sharpe (MRS)

น้ำตาลเดกซ์โทรส (dextrose)	20	กรัม
เพปโตน (peptone)	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	4	กรัม

สารสกัดจากเนื้อวัว (beef extract)	8	กรัม
Tween 80	1	กรัม
โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate)	3	กรัม
แอมโมเนียมซิเตรต (ammonium citrate)	2	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (dipotassium phosphate)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate)	0.1	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต (manganese sulfate)	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ค่าความเป็นกรด-เบส	6.2 ± 0.05	

นำส่วนผสมทั้งหมดรวมกันแล้วนำไปต้มจนละลาย ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ตามที่กำหนด และทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที

4. Man rogosa and sharpe (MRS) สูตรดัดแปลงสำหรับทดสอบความสามารถในหมักคาร์โบไฮเดรต

เพปโตน (peptone)	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	4	กรัม
Tween 80	1	กรัม
โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate)	3	กรัม
แอมโมเนียมซิเตรต (ammonium citrate)	2	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (dipotassium phosphate)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate)	0.1	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต (manganese sulfate)	0.05	กรัม
ข้าวคั่วบดอบฆ่าเชื้อ	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
ค่าความเป็นกรด-เบส	6.2 ± 0.05	

ส่วนผสมทั้งหมดรวมกันแล้วนำไปต้มจนละลาย ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้ได้ตามที่กำหนด และทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที

5. Skim milk agar

Skim milk (Difco)	50	กรัม
Malt extract agar (Merck)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Skim milk ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 3 โดยใช้ 0.1 N HCl จากนั้นเท Malt extract agar ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 100 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

6. Gelatin agar

Malt extract agar (Merck)	20.0	กรัม
Gelatin	15.0	กรัม
Agar	8.0	กรัม

ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 3.5 โดยใช้ 0.1 N HCl และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 100 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 10 นาที

7. Mannitol salt egg yolk (MSEY) agar

โปรติโอสเปปโทน (proteose peptone)	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อวัว (beef extract)	1	กรัม
น้ำตาลแมนนิทอล (D-mannitol)	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	75	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
ฟีนอลเรด (phenol red)	0.025	กรัม

ค่าความเป็นกรด-เบส

7.4

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมกับน้ำกลั่น หรือน้ำกรอง (deionized water) ปริมาตร 1 ลิตร ต้มจนละลายปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้ได้ตามที่กำหนด และทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที

8. Plate count agar

ทริปโทน (tryptone)	5	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	2.5	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส (dextrose)	1	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
ค่าความเป็นกรด-เบส	7.0	

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมกับน้ำกลั่นหรือน้ำกรอง (deionized water) ปริมาตร 1 ลิตร ต้มจนละลายปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้ได้ตามที่กำหนด และทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที

9. Potato dextrose agar

น้ำต้มมันฝรั่ง (potato infusion)	200	มิลลิลิตร
น้ำตาลเดกซ์โทรส (dextrose)	20	กรัม
วุ้นผง (agar)	20	กรัม
เติมน้ำจนครบ	1000	มิลลิลิตร
ค่าความเป็นกรด-เบส	5.6	

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมกับน้ำกลั่น (distilled water) หรือน้ำกรอง (deionized water) ปริมาตร 1 ลิตร ต้มจนละลาย ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้ได้ตามที่กำหนด และทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที

10. Salmonella Shigella (SS) agar

สารสกัดจากเนื้อวัว (beef extract)	5	กรัม
โปรติโอสเปปโทน (proteose peptone)	5	กรัม
น้ำตาลแล็กโทส (lactose)	10	กรัม
เกลือน้ำดี	8.5	กรัม
เฟอริกซิเตรต (ferric citrate)	1	กรัม
โซเดียมซิเตรต (sodium citrate)	8.5	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต (sodium thiosulfate)	8.5	กรัม
วุ้นผง (agar)	13.5	กรัม
สียกรีนเลียนกรีน (brilliant green)	0.33	มิลลิกรัม
นิวทรัลเรด (neutral red)	0.025	กรัม
ค่าความเป็นกรด-เบส	7.0	

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมกับน้ำกลั่น (distilled water) หรือน้ำกรอง (deionized water) ปริมาตร 1 ลิตร ต้มจนละลาย ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้ได้ตามที่กำหนด และทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที

11. Selenite cystine broth (SE)

ทริปโทน (tryptone)	5	กรัม
น้ำตาลแล็กโทส (lactose)	4	กรัม
โซเดียมเซเลไนต์ (sodium acid selenite)	4	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate)	5.5	กรัม
แอล-ซิสทีน (L-cystine)	0.01	กรัม
ค่าความเป็นกรด-เบส	7.0	

ละลายส่วนผสมในน้ำแล้วต้มให้เดือด ห้ามนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) แบ่งใส่หลอดหรือภาชนะอื่น ๆ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตามปริมาณที่ต้องการโดยวิธีปราศจากเชื้อ อาหารชนิดนี้หลังจากเตรียมแล้วควรใช้ให้หมดภายใน 1 วัน

12. Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar (TCBS)

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
โปรติเอสเพปโทน (proteose peptone)	10	กรัม
โซเดียมซิเตรต (sodium citrate)	10	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต (sodium thiosulfate)	10	กรัม
น้ำดีของวัว (oxgall)	8	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
น้ำตาลแซ็กคาไรส (saccharose)	20	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	10	กรัม
บรอมไทมอลบลู (bromthymol blue)	0.04	กรัม
ไทมอลบลู (thymol blue)	0.04	กรัม
เฟอริกซิเตรต (ferric citrate)		
ค่าความเป็นกรด-เบส	8.6	

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมกับน้ำกลั่น (distilled water) หรือน้ำกรอง (deionized water) ปริมาตร 1 ลิตร ต้มจนละลาย ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้ได้ตามที่กำหนด และทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที

13. Tripel sugar iron agar

สารสกัดจากเนื้อวัว (beef extract)	3	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3	กรัม
เพปโทน (peptone)	15	กรัม
โปรติโอสเพปโทน (proteose peptone)	5	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส (dextrose)	1	กรัม

น้ำตาลแล็กโทส (lactose)	10	กรัม
น้ำตาลซูโครส (sucrose)	10	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulfate)	0.2	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	5	กรัม
วุ้นผง (agar)	12	กรัม
ฟีนอลเรด (phenol red)	0.024	กรัม
ค่าความเป็นกรด-เบส	7.4	

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วแบ่งใส่ในหลอดทดลอง นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน แล้วนำออกมาวางให้แข็งตัวในลักษณะเอียง โดยให้มีทั้งส่วนที่เป็น butt และ slant

14. Tryptic soy broth

ทริปโทน (tryptone)	17	กรัม
สารสกัดจากถั่วเหลือง (soytone)	3	กรัม
ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (dipotassium hydrogen phosphate)	2.5	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส (dextrose)	2.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	5	กรัม
ค่าความเป็นกรด-เบส	7.3	

ในกรณีที่ต้องการใช้ Tryptic soy broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ให้เติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปจนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

15. Tryptose sulfite cycloserine (TSC) agar

ทริปโทน (tryptone)	15	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
ซอยโทน (soytone)	5	กรัม
เฟอร์ริกแอมโมเนียมซิเตรต (ferric ammonium citrate)	1	กรัม
โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (sodium metabisulfite)	1	กรัม

วุ้นผง (agar)	20	กรัม
ค่าความเป็นกรด-เบส	7.6	

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมกับน้ำกลั่น (distilled water) หรือน้ำกรอง (deionized water) ปริมาตร 1 ลิตร ต้มจนละลาย ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้ได้ตามที่กำหนด และทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที

16. Xylose lysine desoxycholate agar (XLD)

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3	กรัม
แอล-ไลซีน (L-lysine)	5	กรัม
น้ำตาลไซโลส (xylose)	3.75	กรัม
น้ำตาลแล็กโทส (lactose)	7.5	กรัม
น้ำตาลแซ็กคาไรโรส (saccharose)	7.5	กรัม
โซเดียมเดสออกซีโคเลต (sodium desoxycholate)	2.5	กรัม
เฟอริกแอมโมเนียมซิเตรต (ferric ammonium citrate)	6.8	กรัม
โซเดียมไธโอซัลเฟต (sodium thiosulfate)	5	กรัม
วุ้นผง (agar)	15	กรัม
ฟีนอลเรด (phenol red)	0.8	กรัม
ค่าความเป็นกรด-เบส	7.4	

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำ 1000 มิลลิลิตร ต้มให้ละลายจนเดือด ห้ามนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave)