บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. ตัวอย่างอาหารทะเลแห้ง

1.1 หมึกกะตอยแห้ง

1.2 หมึกไข่

1.3 หอยหวานริวกิว

1.4 ปลาหวาน

1.5 เต่าทองสามรส

2. วัสดุอุปกรณ์

2.1 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

2.2 หลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิลิตร

2.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์

2.4 ลูป (Loop)

2.5 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettle-Toledo รุ่น PG 802-S ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

2.6 ไมโครปิเปต (Micropipette) ยี่ห้อ Gilson รุ่น N21808C ประเทศฝรั่งเศส

2.7 สไลด์และแผ่นปิดสไลด์

2.8 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS-325 ประเทศญี่ปุ่น

2.9 ตู้เพาะเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น KG 8540 ประเทศเยอรมนี

2.10 ไม้บรรทัด

2.11 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE400 ประเทศเยอรมนี

2.12 กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Olympus รุ่น CH30RE200 ประเทศเยอรมนี

2.13 เครื่องปั่นผสม (Vortex) ยี่ห้อ Genie-2 ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.14 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Helios Delta รุ่น 9423 UV 1002E ประเทศอังกฤษ

2.15 ไม้พันสำลี

2.16 หัวกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Minisart ประเทศเยอรมนี

2.17 กระบอกตวง

2.18 หลอดปั่นเหวี่ยง

2.19 บีกเกอร์

2.20 ขวดรูปชมพู่ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร

2.21 แท่งแก้วสามเหลี่ยม

2.22 ถุงพลาสติก

2.23 เครื่องตีผสมอาหาร (Stomacher)

2.24 กรรไกร

3. สารเคมี

3.1 โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

3.2 Gram's crystal violet solution

3.3 Gram's safranin O solution

3.4 Gram's iodine solution

3.5 Gram's alcohol solution

3.6 Alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์

3.7 Catalase reagent

3.8 Oxidase reagent

3.9 Nitrate reagent

3.10 Kovac' s reagent

3.11 Methy red reagent

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 0.85% (w/v) Normal saline

4.2 Trypticase Soy Agar (TSA) ยี่ห้อ Bacto ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.3 Trypticase Soy Broth (TSB) ยี่ห้อ Bacto ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.4 Mueller Hinton Agar (MHA) ยี่ห้อ Difco ประเทศสหรัฐอเมริกา

4.5 Plate Count Agar ยี่ห้อ Difco ประเทสสหรัฐอเมริกา

4.6 Plate Count Agar ที่เติม 7.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) NaCl

4.7 MacConkey Agar ยี่ห้อ Difco ประเทสสหรัฐอเมริกา

5. แบคทีเรียโพรไบโอติกและแบคทีเรียทดสอบ

แบคทีเรียโพรไบโอติกและแบคทีเรียทดสอบได้มาจากห้องปฏิบัติการของรองศาสตราจารย์ ดร. สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

5.1 แบคทีเรียโพรไบโอติก 5 สายพันธุ์

5.2 แบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งแปรรูป

5.3 *E. coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อควบคุม

5.4 *S. aureus* ATCC 25923 เป็นเชื้อควบคุม

วิธีดำเนินการทดลอง

จากการศึกษางานวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์ และแบคทีเรียก่อโรค" ที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 จากการดำเนินงานได้ประสบผลสำเร็จและได้องค์ความรู้ดังต่อไปนี้คือ ทราบถึงปริมาณและชนิดของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลแห้งและแปรรูป ได้แก่ อาหารทะเลแห้งและแปรรูปมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีและแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มเท่ากับ $1.00 \pm 0.50 \times 10^2 - 5.23 \pm 0.63 \times 10^9$, $0.00 - 1.04 \pm 0.04 \times 10^5$ และ $1.00 \pm 0.00 \times 10^2 - 3.12 \pm 0.18 \times 10^9$ CFU/g โดยแบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus*, *Bacillus* และ *Pantoea* เป็นแบคทีเรียที่พบได้มากที่สุดในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล (มากกว่าร้อยละ 50) นอกจากนั้นยังพบแบคทีเรียชนิดอื่นด้วยเช่นกัน ได้แก่ *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. hemolyticus*, *Acinetobacter* spp., *Bordetella holomesii*, *Burkholderia cepacia* complex, *Kluyvera cryocrescens*, *Neisseria weaveri*, *Rahnella aquatilis*, *Shigella dysenteriae*, *Serratia ficaria*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* และ *S. rubidaea* และต่อมาได้ทำการพัฒนาแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่พบว่าปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูป โดยเริ่มต้นจากแบคทีเรียกลุ่ม *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารที่สำคัญที่สุดชนิดหนึ่งและพบอุบัติการณ์การเกิดโรคอาหารเป็นสูงที่สุดชนิดหนึ่งของประเทศไทย (สำนักระบาดวิทยา, 2545; 2548)

ดังนั้นเพื่อทำให้เกิดสารต้านจุลชีพชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพสูงจากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการควบคุมมาตรฐานทางแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปในจังหวัดชลบุรีจึงทำการศึกษาต่อเนื่อง ดังนี้

1. แบคทีเรียโพรไบโอติกที่นำมาศึกษาเพื่อการควบคุมแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารชนิดต่างๆ (Nimrat et al., 2008)

นำแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ที่แยกได้จากอาหารทะเลแห้งและทำการจำแนกสายพันธุ์เพื่อยืนยันว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่เป็นแบคทีเรียก่อโรคจากห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาของ รองศาสตราจารย์ ดร. สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2. แบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูป (Nimrat et al., 2008)

คัดแยกแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลประเภทต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้ง เป็นต้น นอกจากนี้ยังนำแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลประเภทต่าง ๆ จากโครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์และแบคทีเรียก่อโรค" ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 มาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้

2.1 การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปทั้งหมด (Total heterotroph; Jeyasekaran et al., 2004)

ใช้กรรไกรปลอดเชื้อตัดตัวอย่างอาหารให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างมา 50 กรัม ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติมสารละลาย Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BF) ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ลงในถุง นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีผสมอาหาร (Stomacher) เป็นเวลา 60 วินาที จะได้ตัวอย่างที่มีระดับความเจือจาง 10^{-1} จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างจนถึงระดับความเจือจาง 10^{-6} แล้วถ่ายตัวอย่างทีละระดับความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-6} ปริมาตรละ 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วด้วยวิธีสเปรดเพลท (Spread plete) นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผล และจำแนกแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปโดยนำโคโลนีที่แตกต่างกันที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามวิธีการของ Branner (1984); Jones and Collina (1986); Kocur (1986); Kloss and Schilefer (1986); Seeliger and Jones (1986); Sneath et al., (1986); Holt et al., (1994)

2.2 การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มทนเกลือ (Salt tolerant; Garcia Fontan et al., 2007)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่เปลี่ยนจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 7.5 เปอร์เซ็นต์ และจำแนกแบคทีเรียกลุ่มทนเกลือ โดยนำโคโลนีที่แตกต่างกันที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามวิธีการของ Branner (1984); Jones and Collina (1986); Kocur (1986); Kloss and Schilefer (1986); Seeliger and Jones (1986); Sneath et al., (1986); Holt et al., (1994)

2.3 การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี (Enterobacteriaceae; Finney et al., 2003)

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.1 แต่เปลี่ยนจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey Agar และจำแนกแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี โดยนำโคโลนีที่แตกต่างกันที่พบบนอาหารเลี้ยงเชื้อไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามวิธีการของ Branner (1984); Jones and Collina (1986); Kocur (1986); Kloss and Schilefer (1986); Seeliger and Jones (1986); Sneath et al., (1986); Holt et al., (1994)

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูป

การศึกษาฤทธิ์ของแบคทีเรียโพรไบโอติกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียในครั้งนี้ได้วางแผนประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียชนิดอื่นเพิ่มเติมจากแบคทีเรียกลุ่ม *S. aureus* ที่ได้ทำการศึกษาไปก่อนหน้านี้ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์และแบคทีเรียก่อโรค" ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 ทั้งนี้เพื่อให้การศึกษาฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกมีความครอบคลุมและสามารถนำไปสู่การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการยับยั้งหรือควบคุมแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูป โดยมีขั้นตอนการวิจัยดังนี้

3.1 การเตรียมส่วนใสของแบคทีเรียโพรไบโอติก

นำแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละชนิดมาเลี้ยงเชื้อและนำเซลล์แขวนลอยไปปั่นเหวี่ยงตามวิธีของ Nimrat et al. (2008) แล้วนำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมากรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แบ่งสารออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

1) ส่วนใสของแบคทีเรียโพรไบโอติกชนิดเดียว

2) ส่วนใสของแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละชนิดมาผสมกันในอัตราส่วนที่เท่ากัน

3.2 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียโพรไบโอติก

นำเซลล์แขวนลอยของโพรไบโอติกแต่ละชนิดมาปรับความเข้มข้นด้วยเครื่องสเปคโตร-โฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.5 A.U. จากนั้นแบ่งเซลล์แขวนลอย ออกเป็น 2 ส่วน ดังนี้

1) เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียโพรไบโอติกชนิดเดียว

2) เซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ละชนิดมาผสมกันในอัตราส่วนที่เท่ากัน

3.3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคทีเรียโพรไบโอติก

นำแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่คัดแยกได้จากการทดลองในข้อ 2 และคัดแยกได้จากโครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์และแบคทีเรียก่อโรค" ของสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคทีเรียโพรไบโอติกในข้อ 3.1และ 3.2 โดยดำเนินการทดสอบด้วยเทคนิค Agar well diffusion assay ตามวิธีการของ NCCLS (1997) และ Asha Devi et al. (2008) ดังนี้

ป้าย (Swab) แบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 10^4 CFU/mL ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Agar (MHA) ด้วยไม้พันสำลีปราศจากเชื้อ วางจานเพาะเชื้อไว้ 15 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแล้ง แล้วเจาะอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ด้วย Metallic borer ปราศจากเชื้อ จากนั้นเติมส่วนใสและเซลล์แขวนลอยของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสม จากข้อ 3.1 และ 3.2 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MHA วัดขนาดบริเวณยับยั้งรอบหลุมเป็นมิลลิเมตร หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ *E. coli* ATCC 25922 และ *S. aureus* ATCC 25923 เป็นเชื้อควบคุม ต่อมาทำการคำนวณค่าประสิทธิภาพการยับยั้งตามวิธีการของ Leonel Ochoa-Solano and Olmos-Soto (2006)

$$[(\pi \times (\text{รัศมีบริเวณยับยั้ง})^2) - (\pi \times \text{รัศมีของหลุม } (3^2))] / (\pi \times 3^2)$$

และคำนวณดัชนีค่าการยับยั้ง ตามวิธีการของ Leonel Ochoa-Solano and Olmos-Soto (2006)

ดัชนีค่าการยับยั้ง: - (0), 1+ (0.01-0.5), 2+ (0.51-0.7), 3+ (0.71-1), 4+ (1.01-2), 5+ (2.01-3), 6+ (3.01-4), 7+ (4.01-5), 8+ (5.01-6), 9+ (6.01-7), 10+ (7.01-8)