

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์คุณภาพ

ก-1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

1. ภาชนะอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
2. ตู้อบไฟฟ้า (Hot Air Oven)
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการวิเคราะห์

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105°C นาน 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้นหลังจากนั้นชั่งน้ำหนัก
2. ทำเช่นเดียวกับข้อ 1 ช้าจนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนอย่างละเอียดประมาณ 1-2 กรัม ใส่ในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว
4. นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105°C นาน 5-6 ชั่วโมง
5. นำออกจากตู้อบใส่โถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งน้ำหนัก
6. อบซ้ำอีกครั้งประมาณ 30 นาที และทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
7. คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100$$

เมื่อ M_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

M_2 คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

ก-2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์การย่อยโปรตีน ประกอบด้วยเตาเผาและเครื่องดักจับกรด
2. อุปกรณ์กลั่นโปรตีน
3. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร และขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
4. ปิเปต (แบบกระเปาะ) ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
5. บิวเรตขนาด 25 มิลลิลิตร
6. ลูกแก้ว
7. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

สารเคมี

1. สารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) และโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) อัตราส่วน 1 : 10
2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4)
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40
4. กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 40
5. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N
6. อินดิเคเตอร์เป็นสารผสมระหว่างเมทิลเรด เมธีลีนบลู และโบรโมครีซอลกรีน

วิธีการวิเคราะห์

ขั้นตอนการย่อย

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1-3 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน
2. ใส่สารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟตและโพแทสเซียมซัลเฟต ปริมาณ 5 กรัม
3. เติมกรดซัลฟิวริกปริมาณ 20 มิลลิลิตร
4. วางหลอดย่อยในเครื่องย่อยแล้วประกอบสายยางระหว่างฝาครอบ ขวดใส่ต่างและเครื่องดักจับไอกรดให้เรียบร้อย

5. เปิดสวิตช์เครื่องดักจับไอกรดและเตาย่อยแล้วตั้งอุณหภูมิ 200°C นาน 30 นาที จากนั้นปรับเพิ่มอุณหภูมิเป็น 400°C ย่อยต่ออีก 60 นาที จนได้สารละลายใส แล้วปล่อยให้เย็น

ขั้นตอนการกลั่นและไตเตรท

1. จัดอุปกรณ์กลั่น แล้วเปิดสวิตช์ให้ความร้อน และเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่น
2. นำขูดรูปชมพู ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริก (เข้มข้นร้อยละ 4) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอร์แล้วไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรด
3. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อย 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ทำปฏิกิริยาเกินพอ สังเกตให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลขุ่น
4. กลั่นให้ได้ของเหลวอยู่ในระดับ 125 มิลลิลิตร
5. ไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 0.1 N จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง
6. คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(A - B) \times N \times 1.4007 \times F}{W}$$

- เมื่อ
- A คือ ปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
 - B คือ ปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรทกับแบลนด์ (มิลลิลิตร)
 - N คือ ความเข้มข้นของกรด (N)
 - F คือ แฟคเตอร์ (5.85)
 - W คือ น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

ก-3. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

1. Soxhlet apparatus
2. Soxhlet extraction tube
3. หลอดใส่ตัวอย่าง (Thimble)
4. ตู้อบไฟฟ้า (Hot air oven)

5. เครื่องชั่งไฟฟ้า
6. โถดูดความชื้น

สารเคมี

ปิโตรเลียมอีเทอร์หรือเฮกเซน

วิธีการวิเคราะห์

1. นำ Soxhlet extraction tube สำหรับการหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้า ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งที่ทราบน้ำหนัก 3.5 กรัม บนกระดาษกรอง ห่อให้มิดชิดใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง (Thimble)
3. นำหลอดตัวอย่างใส่ลงใน Soxhlet extraction tube เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ ประมาณ 150 มิลลิลิตร
4. ประกอบอุปกรณ์ชุดกลั่นไขมัน พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นและเปิดสวิทช์ให้ความร้อน
5. นำไปสกัดไขมันภายใต้สภาวะในการสกัด ดังนี้

Extraction temperature	150 °C
Boiling time	30 min
Solvent reduction A:	5 x 15 ml
Extraction time	80 min
Solvent reduction B:	8 min
Solvent reduction C:	5 min
Solvent reduction interval	3 min
Solvent reduction phase	3 sec
6. นำส่วนของ Ether ที่ละลายไขมันที่สกัดได้ ไปไล่ Ether ออกโดยให้ความร้อนบน Hot plate ภายในตู้ควัน
7. เมื่อไล่ Ether ออกหมดแล้ว ให้นำไขมันที่แยกได้ไปอบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลานาน 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
8. ชั่งน้ำหนักแล้วอบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

9. คำนวณหาปริมาณไขมันจากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{W_2 \times 100}{W_1}$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนัก Soxhlet extraction tube ก่อนอบ

W_2 คือ น้ำหนัก Soxhlet extraction tube หลังอบ

ก-4. การวิเคราะห์ปริมาณเส้นใย (Crude fiber) (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดวิเคราะห์หาเส้นใย ประกอบด้วยปีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิเมตร เครื่องควบแน่นและเตาให้ความร้อน

2. กระดาษกรองเบอร์ 41

3. suction funnel

4. กรวยกรอง

5. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ

6. ตู้อบไฟฟ้า (Hot air oven)

7. เตาอบ

8. โถดูดความชื้น

9. เครื่องชั่ง

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้นร้อยละ 1.25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

3. เอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95

วิธีการทดลอง

1. นำกระดาษกรองอบในตู้อบ $105^{\circ}C$ นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก

2. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียด และผ่านการสกัดไขมันออกแล้ว ประมาณ 2 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร ถ้าตัวอย่างมีไขมันน้อยกว่า 1% การสกัดไขมันออกอาจไม่จำเป็นต้องทำ

3. เติมกรดซัลฟิวริก 200 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง ใส่ Boiling chip ลงไป 2 – 3 ชิ้น เพื่อป้องกันการเดือดแบบ Bumping

4. วางบีกเกอร์ลงบนอุปกรณ์ให้ความร้อนที่ต่อกับเครื่องควบแน่นและเปิดน้ำหล่อเครื่องควบแน่น เปิดสวิตช์ไฟฟ้า และต้มให้เดือดนาน 30 นาที โดยให้เขย่าบีกเกอร์เป็นระยะๆ เพื่อให้ตัวอย่างเกาะที่ผนัง

5. นำบีกเกอร์ออกจากเครื่องย่อย แล้วนำไปกรองขณะร้อนผ่านกระดาษกรอง

6. ล้างกากด้วยน้ำกลั่นที่เดือด 50 – 75 มิลลิลิตร กรองผ่านเครื่องกรอง ทำซ้ำ 3 ครั้ง หรือจนหมดความเป็นกรด

7. นำกากที่ล้างแล้วใส่ในบีกเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร แล้วเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 200 มิลลิลิตร

8. วางบีกเกอร์ลงบนอุปกรณ์ให้ความร้อนที่ต่อกับเครื่องควบแน่นและเปิดน้ำหล่อเครื่องควบแน่น เปิดสวิตช์ไฟฟ้า และต้มให้เดือดนาน 30 นาที โดยให้เขย่าบีกเกอร์เป็นระยะๆ เพื่อให้ตัวอย่างเกาะที่ผนัง

9. นำกากมากรองขณะร้อนผ่านกระดาษกรองแผ่นเดิม ล้างด้วยน้ำกลั่นที่เดือด 50 – 75 มิลลิลิตร กรองผ่านเครื่องกรอง ทำซ้ำ 3 ครั้ง หรือจนหมดความเป็นด่าง

10. ล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ปริมาณ 25 มิลลิลิตร

11. นำกระดาษกรองพร้อมกากใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบและอบในตู้อบ 105°C นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ในโถดูดความชื้น

12. ชั่งน้ำหนักซ้ำจนกระทั่งได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

13. คำนวณหาปริมาณใยอาหารตามสูตร ดังนี้

$$\text{ปริมาณใยอาหาร (ร้อยละ)} = \frac{(M_2 - M_1)}{S} \times 100$$

เมื่อ M_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา

M_2 คือ ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

S คือ น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น

ก-5. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

1. เตาเผา (Muffle furnace)
2. Crucible
3. Hot plate
4. โถดูดความชื้น
5. เครื่องชั่ง

วิธีการวิเคราะห์

1. เมาด้วยกระบือียงเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550°C นาน 3 ชั่วโมง นำออกจากเตาเผาเก็บไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก บันทึกผล
2. ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1. จนกระทั่งได้น้ำหนักที่คงที่ (ในแต่ละซ้ำต่างกันไม่เกิน 3 มิลลิกรัม) หาค่าเฉลี่ย บันทึกผล (W_1)
3. ชั่งตัวอย่างที่บดละเอียดประมาณ 2 กรัม (S) ลงในถ้วยกระบือียงเคลือบ เมาบนเตาไฟฟ้า จนหมดควัน
4. นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550°C จนกระทั่งได้เถ้าสีเทาอ่อน หรือสีขาวสม่ำเสมอ นำออกจากเตาเผา เก็บในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก บันทึกผล
5. ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 4. (ในแต่ละซ้ำต่างกันไม่เกิน 3 มิลลิกรัม) หาค่าเฉลี่ย บันทึกผล (W_2)
6. คำนวณหาปริมาณเถ้าจากสูตร

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{(W_2 - W_1)}{S} \times 100$$

ก-6. การวิเคราะห์ปริมาณพลังงาน (จากการคำนวณ)

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณพลังงาน} = & (\text{ร้อยละโปรตีน} \times 4) + (\text{ร้อยละคาร์โบไฮเดรต} \times 4) + \\ & (\text{ร้อยละไขมัน} \times 9) \end{aligned}$$

ก-7. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (จากการคำนวณ)

ปริมาณคาร์โบไฮเดรตสามารถคำนวณจากสูตร

$$\text{คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)} = 100 - \text{ร้อยละโปรตีน} - \text{ร้อยละของไขมัน} - \text{ร้อยละความชื้น} - \text{ร้อยละของ} - \text{ร้อยละปริมาณเส้นใย}$$

ก-8. การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) (BAM, 2002)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Plate count agar (PCA)
2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution)

1. การเตรียมตัวอย่าง

- 1.1 ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ลงในขวดปลอดเชื้อ
- 1.2 เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 90 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 นาที นำไปทิ้งในตู้เย็น 30 นาที
- 1.3 ทำการเจือจางให้เป็น 1:10, 1:100 และ 1:1000 ตามลำดับ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2. การตรวจนับจุลินทรีย์

- 2.1 ดูดตัวอย่างจากข้อ 1.3 อย่างละ 1 มิลลิลิตร (ทำ 2 ซ้ำ) ลงในจานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว
- 2.2 เติม PCA ประมาณ 15 มิลลิลิตร
- 2.3 เขย่าจานเพาะเชื้อเบาๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัวประมาณ 15 นาที
- 2.4 อบเพาะเชื้อที่ 35°C ในลักษณะคว่ำจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- 2.5 ตรวจนับจุลินทรีย์จากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนประมาณ 30-300 โคโลนี บันทึกผลและรายงานผลการทดลองเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัมต่อตัวอย่าง (CFU/g)

$$\text{CFU/g} = \text{Average no. of colonies} \times \text{Dilution factor}$$

ก-9. การวิเคราะห์หา *E.coli* (BAM, 2002)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. EC broth
2. Levine EMB agar
3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution)

1. การเตรียมตัวอย่าง

- 1.1 ชั่งตัวอย่างๆ ละ 10 กรัม ลงในขวดปลอดเชื้อ
- 1.2 เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 90 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 นาที นำไปทิ้งในตู้เย็น 30 นาที
- 1.3 ทำการเจือจางให้เป็น 1:10, 1:100 และ 1:1000 ตามลำดับ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2. การตรวจนับจุลินทรีย์

- 2.1 การตรวจสอบขั้นแรก (Presumptive test)
 - 2.1.1 เตรียมหลอดทดลองพร้อมหลอดดักก๊าซวางคว่ำในหลอดทดลอง แบบ 3 แถว และแบบ 5 แถว
 - 2.1.2 ดูดตัวอย่างอาหารในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแถว 1, 2, 3 (4,5) ตามลำดับ โดยดูดตัวอย่างอาหารในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองอาหารเลี้ยงเชื้อ LST broth ที่มีหลอดดักก๊าซวางคว่ำในหลอดทดลอง
 - 2.1.3 เขย่า หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ตัวอย่างด้วย vortex จากนั้นนำไปเข้าตูบ่มเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง
 - 2.1.4 อ่านผล ตรวจดูความขุ่นและก๊าซในหลอดดักก๊าซที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอด หลอดที่มีก๊าซ ผลเป็นบวก แล้วทำการตรวจสอบในขั้นยืนยัน
- 2.2 การตรวจสอบขั้นยืนยัน (Confirmed test)
 - 2.2.1 นำหลอดทดลองที่ให้ผลบวกในการตรวจสอบขั้นแรกทุกหลอดมาทำการยืนยันต่อไป ขั้นต่อไป

2.2.2 เตรียมหลอดทดลองพร้อมหลอดดักก๊าซวางคว่ำในหลอดทดลองเพื่อบรรจุอาหารเหลว EC broth ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร ใส่เชื้อที่หมักนิ่งไอน้ำ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.2.3 นำหลอดที่เกิดก๊าซจากการตรวจสอบขั้นแรก เขย่าเบาๆ แล้วใช้ wire loop ซึ่งฉนวนไฟจนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น ถ่ายจากหลอด LST ที่ให้ผลบวก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด EC broth หลอดต่อหลอด

2.2.4 เขย่าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ตัวอย่างด้วย vortex จากนั้นนำไปเข้าตู้บ่มเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิ $44.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 48 ± 2 ชั่วโมง

2.2.5 หลอดที่ให้ผลบวก เชื้อเชือบน Levine EMB agar เข้าตู้บ่มเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง

2.2.6 ถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่สงสัย ซึ่งมีจุดดำตรงกลาง มีหรือไม่มี Metallic sheen นำไปทดสอบ IMViC test นำผลที่ได้มาเปิดตาราง Most Probable Number Index (MPN)

ก-10. การวิเคราะห์หา *Staphylococcus aureus* (BAM, 2002)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Baird-Parker medium (BP)
2. Brain heart infusion (BHI) broth
3. Coagulate plasma
4. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution)

1. การเตรียมตัวอย่าง

- 1.1 ชั่งตัวอย่างๆ ละ 10 กรัม ลงในขวดปลอดเชื้อ
- 1.2 เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 90 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 นาที นำไปทิ้งในตู้เย็น 30 นาที
- 1.3 ทำการเจือจางให้เป็น 1:10, 1:100 และ 1:1000 ตามลำดับ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

2. การตรวจนับ *S.aureus*

- 2.1 ดูดตัวอย่างจากข้อ 1.3 จากระดับความเจือจางที่เหมาะสม จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงบน BP agar จำนวน 2 ซ้ำ
- 2.2 ใช้แท่งแก้วปราศจากเชื้อที่เกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วจาน
- 2.3 อบเพาะเชื้อที่ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 2.4 ตรวจสอบลักษณะโคโลนี เมื่อครบ 30 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่มีสีดำขอบขาวและแหว่ใสรอบโคโลนีมีบริเวณใส (clear zone) เลือกจากจานที่เชื้อเจริญ 20-200 โคโลนี
- 2.5 ทำเครื่องหมายตำแหน่งของโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าว แล้วนำจานอาหารไปบ่มต่ออีก 18 ชั่วโมง ให้นับโคโลนีที่มีดำแหว่หรือไม่มีขอบขาวและไม่มีบริเวณใสด้วย
- 2.6 ถ่ายโคโลนีที่คาดว่าจะเป็น *S.aureus* ลงใน BHI แล้วอบเพาะเชื้อที่ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 2.7 ดูดตัวอย่างจาก 2.6 จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบแล้วเติม coagulate plasma จำนวน 0.3 มิลลิลิตร ตรวจผลอีกครั้งเมื่อครบเวลา 2 ชั่วโมง
- 2.8 อบเพาะเชื้อที่ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตรวจผลการแข็งตัวของ plasma ถ้า plasma ยังไม่แข็งตัว ให้เก็บหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้วตรวจผลอีกครั้ง เมื่อครบ 2 ชั่วโมง

ก-11. การวิเคราะห์หา *Salmonellae spp.* (BAM, 2002)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Lactose broth
2. Rappaport-Vassiliads (RV) medium
3. Selenite cystine (SC) broth
4. Tetrathionate (TT) broth
5. Hekton enteric (HE) agar
6. XYlose lysine desoxycholate (XLD) agar
7. Bismuth sulfite (BS) agar

1. การเตรียมตัวอย่าง

- 1.1 ชั่งตัวอย่างๆ ละ 10 กรัม ลงในขวดปลอดเชื้อ

1.2 เติม Lactose broth จำนวน 90 มิลลิลิตร ปั่นด้วยความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 นาที

1.3 อบเพาะเชื้อที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. การตรวจนับ *Salmonellae* spp.

2.1 Selective enrichment

2.1.1 ผสม Pre-enrichment culture ให้เข้ากัน แล้วดูมาตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร เติกลงใน TBGB 10 มิลลิลิตร และ SCB 10 มิลลิลิตร

2.1.2 อบเพาะเชื้อในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ $43 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 การเพาะเชื้อใน Select agar

2.2.1 นำตัวอย่างจาก Selective enrichment medium (2.2) มาเพาะลงบน BGA และ BSA plates

2.2.2 อบเพาะเชื้อที่ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2.3 ตรวจผลลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้น ดังนี้

- อาหาร BGA : โคโลนีของ *Salmonellae* spp. คือ ไม่มีสี ใส หรือมีสีชมพูแดง ในขณะที่อาหารมีสีชมพูหรือแดง

-อาหาร BSA : โคโลนีของ *Salmonellae* spp. จะมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ บางครั้งอาจมีโคโลนีสะท้อนแสง อาหารรอบๆ โคโลนีสีน้ำตาล

2.3 การจำแนกและการทดสอบทางชีวเคมี

2.3.1 เลือกเฉพาะโคโลนีที่คาดว่าจะ เป็น *Salmonellae* spp. จากอาหาร BGA และ BSA ถ่ายลงใน TSI และ LIA agar โดย streaking the slant และ stabbing the butt

2.3.2 อบเพาะเชื้อที่ $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3.3 ลักษณะเฉพาะของ *Salmonellae* spp. บนอาหาร TSI จะพบสีแดงที่ slant (สภาพเป็นด่าง) และพบสีเหลืองที่ butt (สภาพเป็นกรด) อาจจะมีการสร้าง H_2S ด้วยหรือไม่ก็ได้สังเกตสีดำนอง butt ลักษณะเฉพาะของ *Salmonellae* บนอาหาร LIA จะพบเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งบริเวณผิวและตามรอยที่แทงดูบ อาหารจะมีสีม่วงทั่วหลอด ถ้ามี H_2S จะเห็นเป็นสีดำ

ก-12. การวิเคราะห์ปริมาณยีสต์ และรา (BAM, 2002)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato dextrose agar (PDA)
2. เปปโตน (peptone water) ร้อยละ 0.1 ในหลอดทดลองปริมาตร 9 มิลลิลิตร และในขวดฝาเกลียวปริมาตร 225 มิลลิลิตร

วิธีการตรวจวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกทนร้อน เติมเปปโตนร้อยละ 0.1 จากขวดฝาเกลียวปริมาตร 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตัวอย่างอาหารที่ได้จะมีระดับความเจือจาง 10^{-1}
2. เจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีระดับความเจือจางเป็น 10^{-2} ถึง 10^{-4} โดยใช้เปปโตนร้อยละ 0.1
3. ปิเปตตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตร จากแต่ละระดับความเจือจางลงในจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อ
4. เททับด้วยอาหาร PDA ประมาณ 15-20 มิลลิลิตร แกว่งจานเพาะเชื้อเบาๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว
5. บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C เป็นระยะเวลา 3-5 วัน
6. ตรวจนับจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อและรายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัมต่อตัวอย่าง