บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. วัสดุอุปกรณ์

1.1 สารเคมี

1) Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB)

2) Motility indole lysine medium (MIL)

3) Phosphate buffer

4) Selenite enrichment broth

5) Salmonella – Shigella agar (SS agar)

6) Triple sugar iron agar slant (TSI)

1.2 อุปกรณ์

1) ปิเปตต์ 0.1 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร

2) จานเพาะเชื้อ

3) หลอดทดลอง

4) หลอดดักแก๊ส

5) ช้อนตักสาร

6) แท่งแก้วคนสาร

7) น้ำกลั่น

8) ขวดรูปชมพู่ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร 500 มิลลิลิตร และ 250 มิลลิลิตร

9) ตะเกียงแอลกอฮอล์

10) ห่วงลวด และ เข็มเขี่ย

11) กระบอกตวง ขนาด 500 มิลลิลิตรและ 100 มิลลิลิตร

12) กระดาษชั่งสาร

13) แท่งแก้วทนไฟรูปตัวแอล (L)

14) กระดาษกรอง

15) สำลี กระดาษฟลอย ถุงพลาสติก และยางวง

16) เอทานอล 70% และ 95%

17) บีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ

1.3 อาหารตัวอย่าง

1) สลัดผัก

2) อาหารซีฟู้ด

3) ข้าวกะเพราหมู

1.4. เครื่องมือ

1) เครื่องนึ่งอัดไอ

2) ตู้บ่มเชื้อ

3) เตาไมโครเวฟ

4) เครื่องชั่งน้ำหนัก

5) ตู้ปลอดเชื้อ

6) ตู้อบฆ่าเชื้อ

7) ตู้เย็น

2 วิธีวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างอาหารจากซุปเปอร์มาร์เก็ตในห้างสรรพสินค้า โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารพร้อมบริโภคประเภทสลัดผัก อาหารซีฟู้ด และข้าวผัดกะเพราหมู รวม 3 รายการ โดยเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 3 เดือน ๆ ละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ 2548 ถึง เดือนเมษายน 2548 อาหารแต่ละประเภทเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ แต่ละครั้งและแต่ละห้างสรรพสินค้าเก็บตัวอย่าง 9 ตัวอย่าง จำนวน 3 ห้าง รวมเก็บตัวอย่างแต่ละครั้ง 27 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างอาหารที่เก็บได้บรรจุในถุงพลาสติกแล้วแช่เย็นรวมกันในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งเพื่อควบคุมอุณหภูมิจนถึงห้องปฏิบัติการ และรอการตรวจวิเคราะห์ต่อไป

2.2 การวิเคราะห์คุณภาพอาหาร

2.2.1 การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียโคลิฟอร์มโดยวิธี MPN

2.1.1.1 การตรวจวิเคราะห์โดยวิธี MPN ดำเนินการดังนี้

1) ชั่งอาหาร 25 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตร ที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 ปราศจากเชื้อ 225 มิลลิลิตรบรรจุอยู่ เขย่าให้เข้ากัน

2) ใช้ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายอาหารตัวอย่างในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ที่เตรียมได้จากข้อ 1) จำนวน10 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB) ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า ของสูตรปกติ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรและมีหลอดดักแก๊สบรรจุอยู่ ทำการทดลองเช่นเดียวกันจำนวนทั้งหมด 5 หลอด ต่อ 1 ตัวอย่าง

3) ใช้ปิเปตปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายอาหารเหลวในบัฟเฟอร์ (ในข้อ 1) จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB ที่มีความเข้มข้นปกติ 10 มิลลิลิตรและมีหลอดดักแก๊สบรรจุอยู่ ทำการทดลองจำนวน 1 หลอดต่อ 1 ตัวอย่าง

4) ใช้ปิเปตปลอดเชื้อขนาด 0.1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายอาหารเหลวในบัฟเฟอร์(ในข้อ 1) จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB ที่มีความเข้มข้นปกติ 10 มิลลิลิตร และมีหลอดดักแก๊สบรรจุอยู่ ทำการทดลองจำนวน 1 หลอดต่อ 1 ตัวอย่าง

5) นำหลอดทดสอบตามข้อ 2 ข้อ3 และข้อ 4 ทั้ง 7 หลอด ไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 - 48 ชั่วโมง

6) เมื่อครบ 24 - 48 ชั่วโมง อ่านผลการทดสอบโดยดูหลอดทดสอบที่มีแก๊สไปแทนที่อาหารเลี้ยงเชื้อ BGLB ในหลอดดักแก๊ส ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ถือว่าให้ผลบวก

7) นำผลการทดสอบจากหลอดทดสอบที่ให้ผลบวกทั้ง 3 ความเจือจางจำนวน 7 หลอด ไปเทียบค่า MPN ในตารางค่า MPN แบบ 7 หลอดในภาคผนวก ซึ่งค่ามาตรฐาน MPN ของน้ำและอาหารที่ยอมรับกันควรมีค่า MPN น้อยกว่า 2.2 (สุมาลี เหลืองสกุล, 2539)

2.2.2 การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรียก่อโรคสกุล *Salmonella* ดำเนินการดังนี้

1) ชั่งอาหารตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ 250 มิลลิลิตรที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 ปราศจากเชื้อ 225 มิลลิลิตรบรรจุอยู่เขย่าให้เข้ากัน

2) ใช้ปิเปต 1 มิลลิลิตรดูดสารละลายอาหารตัวอย่างในบัฟเฟอร์

จากข้อ 1 จำนวน 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดสอบที่มีอาหารเหลว Selenite enrichment broth จำนวน 9 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

3) นำเชื้อที่เลี้ยงใน Selenite enrichment broth มา Streak บนอาหารในจานที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Salmonella – Shigella agar นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 - 48 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียดังนี้

ถ้าเป็นโคโลนีของ *Salmonella* sp.จะไม่มีสีและมีจุดสีดำบนโคโลนี ส่วนโคโลนีของ *Shigella* sp.จะมีสีใสและไม่มีจุดสีดำ

4) นำเอาโคโลนีที่คาดว่าเป็น *Salmonella* sp. และ *Shigella* sp. ไปเพาะเชื้อในหลอดทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อ triple sugar iron agar (TSI) โดยวิธี stab และ streak บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผลโดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI กล่าวคือ ถ้าเป็น *Salmonella* sp. จะให้ผลการทดลองเป็น K / A / G+H_2S หรือบางสายพันธุ์เป็น K/A+H_2S เช่น *Salmonella typhi* ส่วน *Shigella* sp. จะให้ผลการทดลองเป็นเพียง K/A เท่านั้น ซึ่งจะทำให้สามารถแยกเชื้อ *Salmonella sp.* และ *Shigella* sp. ออกจากกันได้อย่างชัดเจน

5) แทงเชื้อ (stab) ลงใน Motile - Indole - Lysine – medium บ่มที่อุณหภูมิ 35 - 37 องศาเซลเซียส นาน24 – 48 ชั่วโมงสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะอาหารเลี้ยงเชื้อถ้ามีการเจริญนอกรอย stab แสดงว่าเชื้อเคลื่อนที่ได้ ถ้าสีของอาหารเป็นสีม่วงให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าเป็นสีเหลืองให้ผลลบ เมื่อหยดน้ำยา Kovac ถ้าเกิดเป็นวงสีแดงให้ผลบวก ถ้าเป็นสีเหลืองให้ผลเป็นลบ

ถ้าเป็น *Salmonella* sp. จะให้ผลการทดลองคือสีของอาหารจะเป็นสีม่วงหรือเหลืองก็ได้ (ผลบวกหรือลบ) เมื่อหยดน้ำยา Kovac สีอาหารจะเป็นสีเหลือง (ผลลบ) และอาจเคลื่อนที่หรือไม่ก็ได้ (ผลบวกหรือลบ) แต่ถ้าเป็น *Shigella* sp. จะให้ผลการทดลองคือสีของอาหารจะเป็นสีเหลือง (ผลลบ) เมื่อหยดน้ำยา Kovac จะให้ผลไม่แน่นอน และไม่พบการเคลื่อนที่ ทั้งนี้ต้องดูผลของการทดสอบด้วยวิธี TSI ประกอบด้วย

2.2.3 การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร

1) นำสารอาหารที่ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จาก 2.2.2 (1) มาเจือจางด้วย nutrient broth แบบลดลงทีละ 10 เท่า (ten fold dilution) ตั้งแต่ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} ตามลำดับ ในหลอดทดสอบหลอดละ 10 มิลลิลิตร

2) นำสารละลายอาหารที่เจือจางได้ใน nutrient broth ที่มีความเข้มข้น10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} หลอดละ 1 มิลลิลิตร ไปเพาะเชื้อใน nutrient agar ด้วยวิธี pour plate โดย

แต่ละความเข้มข้นทำ 3 ซ้ำ (อาหารตัวอย่างละ 9 จาน) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง

3) นำจานอาหารที่บ่มไว้มานับปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดด้วยเครื่องนับจุลินทรีย์ (colony counter) นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ Nakhon Sawan Rajabhat University