ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

1.1 Eosin Methylene Blue agar (EMB agar)

Peptone	10.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
K_2HPO_4	2.0	กรัม
Eosin y	0.4	กรัม
Methylene blue	0.065	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดหรือด่างเจือจางให้ได้ประมาณ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (นลิน และศรีกาญจนา, 2546)

1.2 Salmonella Shigella agar (SS agar)

Beef extract	5.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Bile salt mixture	8.5	กรัม
Sodium citrate	10.0	กรัม
Sodium thiosulphate	8.5	กรัม
Ferric citrate	1.0	กรัม
Brilliant green	0.00033	กรัม
Neutral red	0.025	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันปรับความเป็นกรด-ด่างด้วยกรดหรือด่างเจือจางให้ได้ประมาณ 7.0 นำไปต้มให้เดือด เป็นเวลา 1 นาที (Michael and Burton, 1995)

2. Maximum recovery diluent (MRD-broth) สารละลายสำหรับการเจือจาง (Dilution) เชื้ออี. โคไล และเชื้อซาลโมเนลลา (นลิน และศรีกาญจนา, 2546)

Sodium chloride	8.5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

3. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

4. จานเลี้ยงเชื้อ (Plate)

5. ไปเปต (Pipet) ขนาด 10 มิลลิลิตร

6. ไปเปต (Pipet) ขนาด 1 มิลลิลิตร

7. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)

8. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)

การนับเชื้อจุลินทรีย์ (Enumeration of microorganisms)

ใช้วิธีการทำ dilution plate count เป็นเทคนิคการทำให้เชื้อหรือตัวอย่างเจือจางลง (Dilution) ด้วย MRD-broth (Peptone 0.1% water) โดยทำการเจือจางเพิ่มครั้งละ 10 เท่า ตามลำดับ (Ten fold dilution) ตามวิธีของ Michael and Burton (1995)

วิธีการ

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยชั่งส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด นำไปต้มจนละลายและนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 ซ. เป็นเวลา 15 นาที และนำมาเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ (Plate) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2. ทำการเจือจางตัวอย่าง

2.1 ชั่งตัวอย่างหนัก 1 กรัม ใส่ในสารละลาย diluent โดยใช้ MRD-broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเจือจางเท่ากับ 1:10 เขย่าให้เข้ากัน

2.2 ใช้ปิเปต ดูดเชื้อที่เจือจาง 1:10 จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ใน MRD-broth 9 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเจือจางเท่ากับ $1:10^2$ ทำการเจือจางต่อไปเรื่อย ๆ จนได้สารละลายเจือจางเท่ากับ $1:10^5$

3. ทำการ spread plate โดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเจือจาง 1 มิลลิลิตร ใส่ในจาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ในขั้นตอนการ spread plate เกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อจากมูลไก่ใช้สารละลายเจือจางที่ 10^3-10^5 ส่วนเชื้อจากผิวเปลือกไข่ใช้สารละลายเจือจางที่ 10^2-10^4

4. การบ่มเชื้อ

4.1 การบ่มเชื้ออี. โคไล บ่มที่ 35 ซ. ในสภาพที่มีออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2 การบ่มเชื้อซาลโมเนลลา บ่มที่ 37 ซ. ในสภาพที่มีออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. การนับโคโลนี จะเลือกนับ plate ที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 30 – 300 โคโลนี แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณเชื้อ และรายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีของเชื้อต่อตัวอย่าง 1 กรัม (Colony forming units/g, CFU)

ภาคผนวก ข

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นายเจษฎา รัตนวุฒิ	
เกิดเมื่อ	8 ธันวาคม 2521	
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2540	วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีสุราษฎร์ธานี
	พ.ศ. 2544	สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล คณะเกษตรศาสตร์บางพระ
ประวัติการทำงาน	พ.ศ. 2544	บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน)