บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

1. วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือ

1.1 สารเคมีและวัสดุ

เกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) AR Grade บริษัท BDH ประเทศอังกฤษ

แอมพิซิลิน (Ampicillin) ของบริษัท Sigma ประเทศเยอรมัน

กลีเซอรอล (Glycerol) AR Grade ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

แอลกอฮอล์ 95% (Alcohol 95%)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 35 % AR Grade ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

ชุดทดสอบออกซิเดส Bactident® ของบริษัท Merck ประเทศเยอรมัน

ชานอ้อยสายพันธุ์สุพรรณบุรี 10 กิโลกรัม

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Alkaline peptone water (APW) ของบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย

Nutrient Agar (NA) ของบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย

Phenol red agar base ของบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย

Soluble starch AR Grade ของบริษัท BDH ประเทศอังกฤษ

Xylose-Lysine-Deoxycholate (XLD) ของบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย

Thiosulfate-Citrate-Bile Salts-Sucrose agar (TCBS) ของบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย

Petrifilm™ Aerobic plate count ของบริษัท 3M ประเทศสหรัฐอเมริกา

Tryptose Soya Broth (TSB) ของบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย

Tryptose Soya Agar (TSA) ของบริษัท Himedia ประเทศอินเดีย

1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

API 20E ของบริษัท bioMerieux ประเทศฝรั่งเศส

ตู้รมควัน (Smokehouse) ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เครื่องวัดการดูดกลืนกลืนแสง (Spectophotometer) รุ่น Lamda ของบริษัท Perkin-Elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge) ของบริษัท Hermle รุ่น Z200A

หลอดหมุนเหวี่ยงปลอดเชื้อขนาด 50 มล. (Centrifuge tube)

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ของบริษัท Memert ประเทศเยอรมัน

ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) รุ่น U30 ของบริษัท Memert ประเทศเยอรมัน

หม้อนึ่งความดันสูง (Autoclave) รุ่น SS-325 ของบริษัท Tomy ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องผสม (Vortex mixture) รุ่น G-560 E ของบริษัท Scientific industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องปั่น (Stomacher)

เครื่องบันทึกข้อมูล (Data Logger) รุ่น DT800

เครื่องชั่งละเอียด (Balance) ของบริษัท Metler

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)

เครื่องบรรจุแบบสุญญากาศ (Vacuum packed) ของบริษัท Hotpack ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องไมโครเวฟ (Microwave)

ตู้อบลมร้อนแบบถาด (Tray Dryer)

จานเพาะเชื้อพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มม.

โปรแกรมสำเร็จรูป Apident เวอร์ชั่น 2.0

2. ระเบียบวิธีการวิจัย

2.1 การสุ่มขนาดตัวอย่างปลานิล

การสุ่มขนาดตัวอย่างปลานิลโดยใช้แผนการสุ่มตามคู่มือมาตรฐานของ USFWS/AFS - FHS ซึ่งว่าด้วยมาตรฐานของขั้นตอนในการตรวจสอบสุขภาพสัตว์น้ำ (Standard procedure for aquatic animal health inspection) โดยใช้ค่า 10 % APPL (Assumed pathogen prevalence level)

Sample Number

Lot Size (number of fish)	Number of Fish Required for Sample 10% APPL	5% APPL	2% APPL
50	20	35	50
100	23	45	75
250	25	50	110
500	26	55	130
2000	27	60	145
>100,000	30	60	150

Sample number based on an assumed pathogen prevalence level (APPL) in the population

ภาพที่ 7 แผนการสุ่มมาตรฐานของ USFWS/AFS - FHS

ที่มา : www. fws.gov/policy/aquatichandbook/Volume_1/Chapter_5.pdf (2005)

2.2 การศึกษาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดจากบริเวณ ผิวหนัง เหงือก และเครื่องใน ของปลานิล

ศึกษาจำนวนของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในส่วนต่างๆของปลานิลได้แก่ ผิวหนัง เหงือก และเครื่องใน โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.2.1 ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกับ Alkaline peptone water (APW) 225 มล. ด้วย Stomacher นาน 2 นาทีจะได้ความเข้มข้นเริ่มต้น (Primary dilution) เท่ากับ 1:10

2.2.2 เตรียมความเจือจาง (Dilution) ที่ระดับ 10^{-2} 10^{-3} โดยใช้ APW 9 มล. เป็นสารทำเจือจาง

2.2.3 ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วย Petrifilm™ บ่มที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ นาน 24ชม.

แผนการทดลอง

ศึกษาโดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ปัจจัยคือส่วนต่างๆของปลานิล ได้แก่ ผิวหนัง เหงือก และเครื่องใน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 13.0 ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน จากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทรีตเมนต์โดยใช้ DMRT (Duncan's new multiple range Test

2.3 การศึกษาการแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากปลานิล

2.3.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ในปลานิล

1) นำปลานิลที่แช่แข็งที่อุณหภูมิ – 20^0ซ มาทำการละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 25^0ซ จากนั้นใช้มีดแยกส่วนเหงือก เครื่องใน ผิวหนังโดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 25 g

2) นำตัวอย่างจำนวน 25 กรัมใส่ถุงพลาสติกที่ฆ่าเชื้อแล้ว เท 0.85 % NaCl ปริมาตร 225 มล. ลงในอาหาร ตีปั่นตัวอย่างอาหารด้วยเครื่อง Stomacher นาน 2 นาที จะได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1:10

3) เจือจาง10 เท่า (Serial dilution) ในช่วง 10^{-2} 10^{-3} และ10^{-4} ด้วย 0.85 % NaCl ปริมาตร 9 มล.

4) เตรียม Petrifilm™ aerobic plate count (PCA) จากนั้นปิเปตเชื้อจำนวน 1 มล. เพื่อตรวจสอบจำนวนเชื้อโดยใช้เทคนิคแบบปลอดเชื้อโดยทำตัวอย่างละ2 ซ้ำ

5) ตัวอย่างที่ผสมกันเป็นเนื้อเดียวแล้วจำนวน 50 มล. ส่วนที่เหลือจะถูกนำมา Resuscitation โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30^0ซ นาน 6-8 ชั่วโมง

6) นำตัวอย่างที่ผ่านการบ่ม มาทำการ Streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA TCBS และ XLD agar plate จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24-48 ชั่วโมง

7) ตัวอย่างที่ผ่านการบ่มในขั้นตอน Resuscitation ที่เหลือจะถูกนำมาตรวจสอบ *A. sobria* โดยวิธี Surface plate ใช้อาหาร Starch-ampicillin agar (10mg/L ampicillin) (Palumbo, 1985) เป็น Selective medium โดยทำการเจือจางลง10เท่า ที่ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} โดยใช้ Alkaline peptone water (APW) เป็นสารทำเจือจาง บ่มที่อุณหภูมิ 30^0ซ นาน 24 ชั่วโมง

8) โคโลนีที่ได้จากการ Streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA TCBS และ XLD agar plate จะถูกนำไป Streak plate อีกครั้งจนกระทั่งได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture)

9) นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้มา Streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA slant เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ

2.3.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานและการทดสอบทางด้านชีวเคมี

ศึกษาลักษณะของโคโลนี การย้อมแกรม การจัดเรียงตัวและรูปร่างของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบปฏิกิริยาออกซิเดสและคะตะเลส (Catalase, Oxidase) และทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility test)

2.3.3 การจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ในปลานิล

1. เชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกแยกแล้วจะนำมา Streak plate อีกครั้งด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ นาน 24 ชั่วโมงก่อนนำไปจำแนกด้วย API 20 E (bioMeriux, France)

2. เตรียมสารละลายของแบคทีเรีย (Bacterial suspension) และทำละลายเพื่อคืนรูปสารเคมีด้วย 0.85% NaCl เพื่อใช้ในการทดสอบปฏิกิริยาเคมีต่างๆได้แก่ ONPG ADH LDC ODC CIT H_2S URE TDA IND VP GEL GLU MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY และ ARA

3. สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาชีวเคมีในรูปค่าบวก (Positive) และค่าลบ (Negative) โดยการเปลี่ยนแปลงของสีในแต่ละปฏิกิริยาจากนั้นนำข้อมูลที่ได้ ทำการวิเคราะห์และแปลผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Apident เพื่อจำแนกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในปลานิล

2.4 ศึกษาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในระหว่างกระบวนการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น

ศึกษาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total plate count) ตลอดกระบวนการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น ในขั้นตอนต่างๆดังนี้ 1. ปลานิลแช่เยือกแข็ง 2. การตัดหัว, ควักไส้และล้างด้วยน้ำสะอาด 3. การแช่น้ำเกลือ 4. การรมควันแบบเย็น และ 5. เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2^{0}ซ นาน 12 ชม. มีขั้นตอนดังนี้

2.4.1 ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกับ Alkaline peptone water (APW) ปริมาตร 225 มล. ด้วย Stomacher นาน 2 นาทีจะได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1:10

2.4.2 เตรียมเจือจางที่ระดับ 10^{-2}และ10^{-3} โดยใช้ APW 9 มล. เป็น สารทำเจือจาง

2.4.3 ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดด้วย Petrifilm™ aerobic plate count (3M, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37^{0}ซ นาน 24 ชม.

แผนการทดลอง

ศึกษาโดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ปัจจัยคือขั้นตอนในกระบวนการรมควัน ได้แก่ ปลานิลแช่เยือกแข็ง (Frozen fish) การชำแหละและล้างด้วยน้ำ (Evisceration and washing) การแช่น้ำเกลือ (Brining) การรมควันแบบเย็น (Cold smoking) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ (Storage) 2^{0}ซ นาน 12 ชม. ทำการทดลอง2 ซ้ำ จำนวนหน่วยการทดลองทั้งหมดคือ 5x2 คือ 10 หน่วยทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 13.0 ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน จากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทรีตเมนต์โดยใช้ DMRT (Duncan's new multiple range Test)

2.5 การศึกษาจำนวนของเชื้อ *A. sobria* ในส่วนผิวหนัง เหงือก เครื่องใน และเนื้อของปลานิล

การศึกษาจำนวนของเชื้อ *A. sobria* ในส่วนต่างๆของปลานิลได้แก่ ผิวหนัง เหงือก เครื่องในและเนื้อ โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.5.1 ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกับ Alkaline peptone water (APW) 225 มล. ด้วย Stomacher นาน 2 นาทีจะได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1:10

2.5.2 เตรียมทำเจือจางที่ระดับ 10^{-2}และ10^{-3} โดยใช้ APW 9 มล. เป็นสารทำเจือจาง

2.5.3 ตรวจสอบจำนวนเชื้อ ด้วยอาหาร SAA โดยวิธี Surface plate บ่มที่อุณหภูมิ 28^{0}ซ นาน 24 ชม. (Palumbo, 1985)

แผนการทดลอง

ศึกษาโดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) ปัจจัยคือส่วนต่างๆของปลานิล ได้แก่ ผิวหนัง เหงือก เครื่องใน และเนื้อ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 13.0 ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน จากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทรีตเมนต์โดยใช้ DMRT (Duncan's new multiple range Test)

2.6 การศึกษากราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. sobria* ที่แยกได้จากปลานิล

2.6.1 การเตรียมเชื้อ *A. sobria*

1. เชื้อ *A. sobria* ที่แยกได้จากปลานิล ซึ่งเก็บใน NA slant ที่อุณหภูมิ 4^{0}ซ(Secondary stock culture)
2. ถ่ายลง TSB บ่มที่อุณหภูมิ 30^{0}ซ นาน24 ชั่วโมง
3. ปิเปตมา 500 ไมโครลิตร (µL) เติมลงในกลีเซอรอล 1 มล. ลงใน Vial เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18^{0}ซ (Primary stock culture)
4. ทำการถ่ายเชื้อ (Subculture) อย่างน้อย 2-3 ครั้ง จาก Secondary stock culture เพื่อกระตุ้นให้เชื้อเจริญและมีความแข็งแรง

5. ตรวจนับจำนวน *A. sobria* ด้วยวิธี Surface plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ SAA (Palumbo, 1985) ทำเจือจางลง 10 เท่า (Tenfold serial dilution) ที่ระดับ 10^{-5} 10^{-6}และ10^{-7} โดยใช้ Alkaline peptone water (APW) เป็นสารทำเจือจาง

2.6.2 การศึกษากราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. sobria*

เมื่อนำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ถ้าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะใสจะเปลี่ยนเป็นขุ่น ซึ่งความขุ่นนี้จะเพิ่มตามจำนวนเซลล์ที่มากขึ้น ดังนั้นการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจึงสามารถทำได้โดยการนำไปวัดความขุ่น โดยใช้เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ และนับจำนวนโดยใช้วิธีการ Dilution plate count (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2536: จุฬารัตน์ ปริยชาติกุล, 2542)

1. ใช้ลูปทำการถ่ายเชื้อที่ได้จากข้อ 5.5.4 ลงใน TSB ปริมาตร 100 มล. นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30^{0}ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. จากนั้นนำมาทำการเจือจางให้ได้ความเจือจางที่เหมาะสมด้วย Alkaline peptone water (APW) และทำการ Pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30^{0}ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนเชื้อรายงานในรูป $\log_{10}$ cfu/ml

3. เมื่อทราบจำนวนเชื้อเริ่มต้นจากข้อ 5.5.2 แล้ว ทำการเจือจางเชื้อเพื่อให้มีจำนวนเชื้ออยู่ในช่วง 2 $\log_{10}$cfu/ml โดยใช้ Alkaline peptone water (APW) ปริมาตร 99 มล. และใช้ TSB ปริมาตร 99 มล. ในระดับ ความเจือจางสุดท้าย ซึ่งจะได้ TSB ที่มีจำนวนเชื้ออยู่ประมาณ 2 $\log_{10}$cfu/ml

4. นำ TSB ที่มีจำนวนเชื้ออยู่ประมาณ 2 $\log_{10}$cfu/ml ไปทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30^{0}ซ. โดยทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600nm}) และนับจำนวนเชื้อโดยการ Pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30^{0}ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนเชื้อรายงานในรูป $\log_{10}$cfu/ml

5. นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (OD_{600nm}) จำนวนเชื้อที่นับได้ และเวลาที่ทำการสุ่มตัวอย่าง มาทำการสร้างกราฟการเจริญของเชื้อ โดยให้แกน X คือเวลาที่ทำการสุ่มตัวอย่าง และ แกน Y คือ ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (OD_{600nm}) และจำนวนเชื้อที่นับได้

2.7 การศึกษาการเหลือรอดของเชื้อ *A. sobria* ในระหว่างการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น ดัดแปลงจากวิธีของ Cardinal et al, 2001

การศึกษาการเหลือดรอดของเชื้อ *A. sobria* ในระหว่างขั้นตอนการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น มีขั้นตอนดังนี้

2.7.1 การเตรียมปลานิล เริ่มจากการนำปลาที่ถูกแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20^{0}ซ มาทำการละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 25^0 ซ นาน 2 ชม.

2.7.2 ทำการตัดหัว ควักไส้และตัดแต่งปลานิลด้วยมีดจากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด

2.7.3 เตรียมเชื้อ *A. sobria*ที่ระดับความเข้มข้น 10^2 10^4 10^6 10^8 cfu /ml โดยใช้ 0.85% NaCl เป็น สารทำเจือจาง

2.7.4 เตรียมเชื้อ *A. sobria* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 10^2 10^4 10^6 และ 10^8 cfu /ml ปริมาณ 1,000 มล. โดบใช้โลหะที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็นภาชนะบรรจุ นำปลานิลมาแช่ในสารละลายเชื้อ *A. sobria* ปริมาตร 1,000 มล. ให้ท่วมชิ้นปลา นาน 2 นาที ทำ 2 ซ้ำ/ความเข้มข้น และเตรียมปลานิลที่ไม่มีการเติมเชื้อ *A. sobria* เพื่อใช้เป็นตัวควบคุม (Control)

2.7.5 ตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี Surface plate ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ SAA (Palumbo, 1985) ตรวจสอบ *A. sobria* 2 ซ้ำ / ระดับความเข้มข้น รายงานค่า $\log_{10}$ cfu/g

2.7.6 เตรียมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว (NaCl) (360g/L) นำปลาที่ผ่านการตัดแต่งแช่น้ำเกลือที่อุณหภูมิ 2^{0}ซ นาน 6 ชั่วโมง (อัตราส่วนปลาต่อน้ำเกลือเท่ากับ 1:1)

2.7.7 นำปลานิลที่ผ่านการแช่น้ำเกลือมาล้างและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2^{0}ซ นาน 12 ชั่วโมง

2.7.8 ตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี Surface plate ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ SAA (Palumbo, 1985) ตรวจสอบ *A. sobria* 2 ซ้ำ / ระดับความเข้มข้น รายงานเป็น $\log_{10}$ cfu/g

2.7.9 อบแห้งเบื้องต้น (Pre drying) ปลานิลที่อุณหภูมิ 30^{0}ซ นาน 30 นาที

2.7.10 รมควัน ที่อุณหภูมิ 35 ± 1^{0}ซ นาน 45 นาทีโดยใช้ชานอ้อยเป็นวัสดุให้ควัน

2.7.11 ตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี Surface plate ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ SAA (Palumbo, 1985) ตรวจสอบ *A. sobria* 2 ซ้ำ / ระดับความเข้มข้น รายงานค่า $\log_{10}$ cfu/g

2.7.12 นำปลานิลที่ผ่านการรมควันบรรจุถุงโฟลีเอธิลีน (Polyethylene) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 2 ^{0}ซ (Kolodziejska et al., 2001)

แผนการทดลอง

ศึกษาโดยวางแผนการทดลองแบบ 3x4 Asymmetric factorial experiment in completely randomized design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ปัจจัยคือ ขั้นตอนในกระบวนการรมควันแบบ

เย็น ได้แก่ภายหลังการแช่น้ำเกลือ (Brining) ภายหลังการรมควันแบบเย็น (Cold smoking) และภายหลังจากผ่านการแช่น้ำเกลือและรมควันแบบเย็น (Brining & cold smoking) และระดับการปนเปื้อนสังเคราะห์ที่ระดับ 10^2 10^4 10^6 10^8 cfu/ml ทำการทดลอง 2 ซ้ำ จำนวนหน่วยทดลองทั้งหมดคือ 3x4x2 คือ 24 หน่วยทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 13.0 ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน จากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทรีตเมนต์โดยใช้ DMRT (Duncan's new multiple range Test)

2.8 วิธีการเตรียมเชื้อและการตรวจสอบจุลินทรีย์

1) การเตรียมเชื้อ *A. sobria*

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) Starch-ampicillin agar (SAA) (Ampicillin10mg/L)

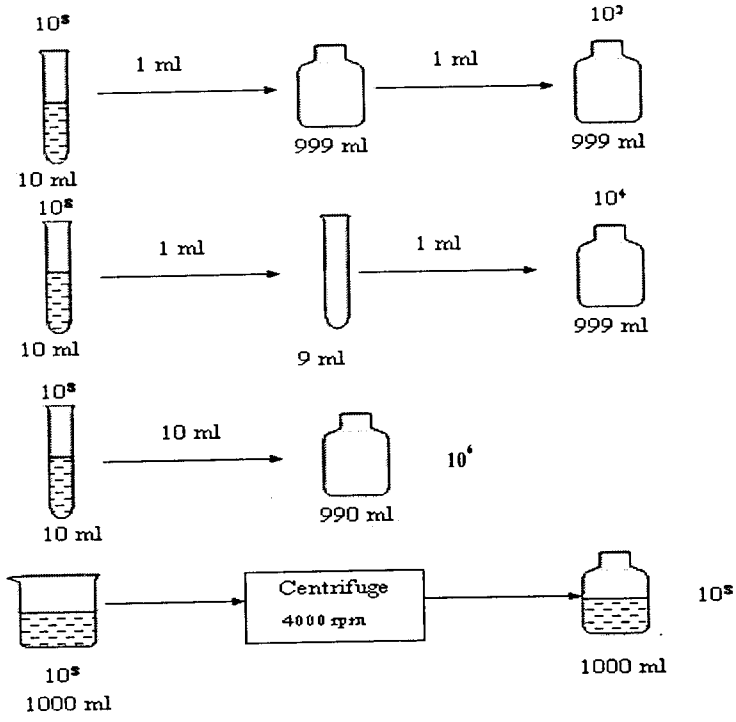
1.2 เตรียม Primary stock culture โดยถ่ายเชื้อ *A. sobria* จาก NA slant จำนวน 1-2 ลูป ลงใน TSB ปริมาณ 6 มล. จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ นาน2ชั่วโมง จากนั้นใช้ Micropipette ดูดมาปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วถ่ายลงใน Vial ที่มีกลีเซอรอลปริมาณ 1 มล. เขย่าให้เข้ากันและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

1.3 เตรียม Secondary stock culture โดยถ่ายเชื้อ *A. sobria* จาก TSB แล้ว Streak ลงบน NA slant จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำเช่นเดิมอีก 2-3 ครั้ง แล้วนำไปเก็บในตู้เย็น อุณหภูมิ 4°ซ

2.9 เตรียมเชื้อ *A. sobria* ที่ระดับความเข้มข้น 10^2 10^4 10^6 10^8 cfu /ml

2.9.1 นำเชื้อ *A. sobria* (10^8 cfu/ml) ที่บ่มในอาหาร TSB ทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ใช้ความเร็วรอบ 4,000 รอบ / นาที นาน 10 นาทีแยกส่วนที่เป็น Supernatant ออก จากนั้นเติม 0.85 % NaCl แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ทำซ้ำเช่นเดียวกัน 2-3 ครั้ง จะได้ เชื้อ *A. sobria* ที่พร้อมนำไปทำการเจือจางต่อไป

2.9.2 เตรียม 0.85 % NaCl ในปริมาตรที่เหมาะสมและถ่ายเชื้อ *A. sobria* เพื่อทำการเจือจางให้ได้ระดับ 10^2 10^4 10^6 cfu/ ml ตามลำดับ ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 การเตรียมเชื้อ *Aeromonas sobria* ที่ระดับความเข้มข้น 10^2 10^4 10^6และ10^8 cfu/ml ตามลำดับ

2.10 การถ่ายเชื้อ *A. sobria* ลงในปลานิล ดัดแปลงจาก Niedziela JC. (1997)

2.10.1 เตรียมเชื้อ *A. sobria* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 10^2 10^4 10^6และ 10^8 cfu/ ml ปริมาตร 1,000 มล. / ระดับความเข้มข้น โดยใช้ถาดโลหะที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็นภาชนะ

2.10.2 นำปลานิลที่ผ่านการตัดแต่งและแช่น้ำเกลือแล้วมาแช่ในสารละลายเชื้อ *A. sobria* ให้ท่วมชิ้นปลาบนถาดโลหะ นาน 2 นาที/ด้าน ทำ 2 ซ้ำ / ความเข้มข้น

2.11 การตรวจสอบการเหลือรอดของจุลินทรีย์ ดัดแปลงจากวิธีของ Kolodziejska et al. (2002)

ตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เหลือรอดในกระบวนการรมควันด้วยวิธี Total plate count (TPC) ดังนี้

2.11.1.นำชั่งตัวอย่างน้ำหนัก 25 กรัมผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันกับ Alkaline peptone water (APW) จำนวน 225 มล.

2.11.2 เจือจาง 10 เท่า (Tenfold serial dilution) ให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย APW ปริมาตร 9 มล.

2.11.3 ตรวจสอบด้วย Petrifilm™ Total plate count โดยใช้ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ นาน 72 ชั่วโมงเพื่อรอตรวจสอบจำนวนเชื้อจุลินทรีย์

2.12 การตรวจสอบจำนวนเชื้อ *A. sobria* ในระหว่างกระบวนการรมควันแบบเย็น

2.12.1. เก็บตัวอย่างจำนวน 25 กรัม ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกับ Alkaline peptone water (APW) ปริมาตร 255 มล. ตีป่นด้วย เครื่อง Stomacher นาน 2 นาที

2.12.2 ทำการเจือจางลง 10 เท่า (Tenfold serial dilution) ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม ด้วย APW 9 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixture

2.12.3 ตรวจนับจำนวน *A. sobria* ด้วยวิธี Surface plateด้วยอาหาร SAA (Ampicillin 10mg/L) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 28^0 ซ นาน 24 ชั่วโมง (Palumbo, 1985)

2.13 การเตรียม Starch-Ampicillin Agar (SAA) จากวิธีของ Palumbo (1985)

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Phenol red agar base (Himedia) (31 g)

Soluble starch (10g/liter)

Ampicillin (10mg/liter)

การเตรียม

1.ผสม Phenol red agar base 31กรัม Soluble starch 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 1000 มล. หลอมวุ้นให้ละลายจนหมด

2.นำเข้าเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121°ซ นาน15 นาที

3.ลดอุณหภูมิจนเหลือ 50^0ซ เติม Ampicillin 1 %(w/w) ลงไป 1 มล. (10 mg/L) ผสมให้เข้ากัน

4.เทวุ้นลง Sterile petri dishes

การตรวจสอบ

1. Surface plate ที่อุณหภูมิ 28^0ซ นาน 24 ชม.

2. เติม Lugol iodine solution 5 มล. ลงบนอาหาร SAA เพื่อดู Amylose-positive colonies โดยสังเกตจาก Clear zone

3.โคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 ม.ม. มีสีเหลืองน้ำผึ้ง

ภาพที่ 9 ปลานิลจากกระชัง อ.น้ำพอง จ.ขอนแก่น

ภาพที่ 10 ปลานิลที่ผ่านการตัดแต่ง

ภาพที่ 11 ขั้นตอนการแช่เกลือปลานิล

ภาพที่ 12 ขั้นตอนการรมควันแบบเย็น

ภาพที่13 ปลานิลที่ผ่านกระบวนการรมควันแบบเย็น

ภาพที่ 14 *A. sobria* บนอาหาร SAA