

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างกะหล่ำปลีที่ทำการทดลอง

กะหล่ำปลี (*Brassica oleraceae*) ที่ใช้ในการทดลองซื้อจากตลาดบริเวณมหาวิทยาลัยนเรศวร คัดเลือกให้มีขนาดใกล้เคียงกัน ทำการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการทดสอบ ทำการทดสอบภายในเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนทดลองทำการลอกใบนอกของกะหล่ำปลีและตัดส่วนแกนกลางทิ้งไป หั่นฝอยโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ให้มีขนาดชิ้นตัวอย่างประมาณ 0.5 เซนติเมตร x 5.0 เซนติเมตร

เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จังหวัดปทุมธานี ประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 3 ชนิด คือ *Escherichia coli* ATCC 25922 *Salmonella enterica* serovars Typhimurium ATCC 13311 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

วิธีการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 3 ชนิด บนอาหารแข็ง Tryptic soy agar (TSA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อทุก 1 เดือน

วิธีการเตรียมเซลล์แขวนลอย

ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 3 ชนิด ในอาหารเหลว Tryptic soy broth (TSB) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ 2 มิลลิลิตร ลงขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว TSB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในตู้บ่มชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Contherm, Germany) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์แบบควบคุมอุณหภูมิ (Kendro, UK) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายเปปไทน์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ทั้งสารละลายส่วน

ใส่น้ำเซลล์ที่ตกตะกอนมาทำการปรับปริมาตรด้วยสารละลายเปปโทนีอีกครั้งให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 มิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอยที่ได้ไปใช้ในการปลูกถ่ายลงบนกะหล่ำปลีนั้นต่อไป

การเตรียมสารละลายทดสอบ

1. การเตรียมสารละลายกรดอินทรีย์และสารละลายกรดอินทรีย์ผสม

สารละลายที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพกรดอินทรีย์และสารละลายกรดอินทรีย์ผสมมีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ 1) สารละลายกรดแลคติก (Merck, Germany) ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (L1.5) 2) สารละลายกรดซิตริก (Fisher scientific, USA) ที่ระดับความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (C1.5) 3) สารละลายผสมกรดแลคติกและกรดซิตริก ที่ระดับความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอัตราส่วน 1:1 (LC11) 4) สารละลายผสมกรดแลคติกและกรดซิตริก ที่ระดับความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอัตราส่วน 1:2 (LC12) และ 5) สารละลายผสมกรดแลคติกและกรดซิตริก ที่ระดับความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอัตราส่วน 2:1 (LC21)

การคำนวณร้อยละของปริมาณกรดอินทรีย์คำนวณในรูปแบบโมลาริตี (molarity : M) สารละลายทดสอบประสิทธิภาพกรดอินทรีย์และสารละลายกรดอินทรีย์ผสมทั้งหมดใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวทำละลาย โดยเตรียมสารละลายกรดแลคติกจากสารละลายกรดแลคติก ($C_3H_6O_3$) ร้อยละ 85 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (Merck, Germany) และสารละลายกรดซิตริกจากกรดซิตริก ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 100% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) (Fisher scientific, USA) ทำการเตรียมสารละลายโดยคำนวณเป็นครั้งละ 1,000 มิลลิลิตร ทำละลายและปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ใช้อัตราส่วน (ต่อ 1,000 มิลลิลิตร) ดังนี้คือ

1. L1.5 เตรียมจากสารละลายสารละลายกรดแลคติกจากสารละลายกรดแลคติก 85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) 30 มิลลิลิตร
2. C1.5 เตรียมจากกรดซิตริก 100% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) 15.00 กรัม
3. LC11 เตรียมจากสารละลายสารละลายกรดแลคติกจากสารละลายกรดแลคติก 85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) 8.83 มิลลิลิตร ผสมกับกรดซิตริก 100% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) 7.50
4. LC12 เตรียมจากสารละลายสารละลายกรดแลคติกจากสารละลายกรดแลคติก 85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) 11.78 มิลลิลิตร ผสมกับกรดซิตริก 100% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) 10 กรัม
5. LC21 เตรียมจากสารละลายสารละลายกรดแลคติกจากสารละลายกรดแลคติก 85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) 5.89 มิลลิลิตร ผสมกับกรดซิตริก 100% (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) 5.00 กรัม

สารละลายทดสอบทุกชนิดทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง ในการทดลองใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (DW) เป็นสารละลายควบคุมลบ (negative control) และสารละลายคลอรีนความเข้มข้น 120 ppm (Cl) เป็นสารละลายควบคุมบวก (positive control)

2. การเตรียมสารละลายเกลืออินทรีย์และสารละลายเกลืออินทรีย์ผสม

สารละลายที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพเกลืออินทรีย์และสารละลายเกลืออินทรีย์ผสมมีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ 1) สารละลายโซเดียมแลกเตท (Merck, Germany) ที่ระดับความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (nL1.5) 2) สารละลายโซเดียมซิเตรท (Fisher scientific, USA) ที่ระดับความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (nC1.5) 3) สารละลายผสมระหว่างโซเดียมแลกเตทและโซเดียมซิเตรท ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอัตราส่วน 1:1 (nLC11) 4) สารละลายผสมระหว่างโซเดียมแลกเตทและโซเดียมซิเตรท ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอัตราส่วน 1:2 (nLC12) และ 5) สารละลายผสมระหว่างโซเดียมแลกเตทและโซเดียมซิเตรท ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในอัตราส่วน 2:1 (nLC21) (น้ำหนักต่อปริมาตร)

การคำนวณร้อยละของปริมาณเกลืออินทรีย์คำนวณในรูปแบบโมลาริตี (molarity : M) สารละลายทดสอบประสิทธิภาพเกลืออินทรีย์และสารละลายเกลืออินทรีย์ผสมทั้งหมดเตรียมจากสารละลายโซเดียมแลกเตท ($C_3H_5O_3Na$) ร้อยละ 50 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (Merck, Germany) และโซเดียมซิเตรท ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) ร้อยละร้อยละ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) (Fisher scientific, USA) ทำการเตรียมสารละลายครั้งละ 1,000 มิลลิลิตร ทำละลายและปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ใช้อัตราส่วน (ต่อ 1,000 มิลลิลิตร) ดังนี้คือ

1. nL1.5 เตรียมจากสารละลายโซเดียมแลกเตทร้อยละ 50 (น้ำหนักต่อปริมาตร) 30.00 มิลลิลิตร
2. nC1.5 เตรียมจากโซเดียมแลกเตทร้อยละร้อยละ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) 15.00 กรัม
3. nLC11 เตรียมจากสารละลายโซเดียมแลกเตทร้อยละ 50 (น้ำหนักต่อปริมาตร) 15.00 มิลลิลิตร ผสมกับโซเดียมแลกเตทร้อยละร้อยละ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) 7.50 กรัม
4. nLC12 เตรียมจากสารละลายโซเดียมแลกเตทร้อยละ 50 (น้ำหนักต่อปริมาตร) 10.00 มิลลิลิตร ผสมกับโซเดียมแลกเตทร้อยละร้อยละ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) 10.00 กรัม
5. nLC21 เตรียมจากสารละลายโซเดียมแลกเตทร้อยละ 50 (น้ำหนักต่อปริมาตร) 20.00 มิลลิลิตร ผสมกับโซเดียมแลกเตทร้อยละร้อยละ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) 5.00 กรัม

สารละลายทดสอบทุกชนิดทำการเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนทำการทดลอง ในการทดลองใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (DW) เป็นสารละลายควบคุมลบ (negative control) และสารละลายคลอรีนความเข้มข้น 120 ppm (CI) เป็นสารละลายควบคุมบวก (positive control)

การศึกษาผลของสารละลายทดสอบในการลดปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคบนกะหล่ำปลีหั่นฝอย

1. ผลของชนิดและอัตราส่วนของสารละลายกรดอินทรีย์และกรดอินทรีย์ผสมต่อการลดปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคบนกะหล่ำปลีหั่นฝอย

ทำการทดสอบผลของสารละลาย L1.5 C1.5 LC11 LC12 และ LC21 ในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในกะหล่ำปลีหั่นฝอยภายหลังการล้าง โดยทำการเปรียบเทียบปริมาณ *Escherichia coli* ATCC 25922 *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 บนกะหล่ำปลีหั่นฝอยก่อนและหลังการล้าง ทำการปลูกถ่ายเซลล์แขวนลอยลงบนตัวอย่างกะหล่ำปลีหั่นฝอยด้วยวิธีการสเปรย์ในอัตราส่วน 1:10 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ภายในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow clean air, USA) (Chang and Fang, 2006) ทำการสเปรย์เซลล์แขวนลอย 2.5 มิลลิลิตร ต่อตัวอย่างกะหล่ำปลีหั่นฝอย 25 กรัม ทิ้งไว้ 5 นาที บนตะแกรงนับจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีอยู่บนกะหล่ำปลีหั่นฝอยก่อนการล้าง (BW) รายงานผลเป็นค่า $\log_{10}$ colony-forming unit ต่อกรัม ($\log_{10}$ cfu.g⁻¹) จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายที่เตรียมไว้เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้ปริมาณกะหล่ำปลีหั่นฝอยต่อสารละลายที่อัตราส่วน 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำตัวอย่างกะหล่ำปลีหั่นฝอยไปทิ้งให้สะเด็ดน้ำเป็นเวลา 5 นาที นับจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคที่มีอยู่บนกะหล่ำปลีหั่นฝอยหลังการล้าง รายงานผลเป็นค่า $\log_{10}$ colony-forming unit ต่อกรัม ($\log_{10}$ cfu.g⁻¹) (AW) โดยใช้เทคนิคสเปรดเพลท (Spread plate) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแบ่งแยกและคัดเลือก (selective and differential media) โดย *E. coli* ATCC 25922 ใช้อาหาร violet red bile agar (Himedia, India) *S. typhimurium* ATCC 13311 ใช้อาหาร Sallmonella-Shigella agar (Himedia, India) และ *S. aureus* ATCC 25923 ใช้อาหาร Mannitol salt phenol-red agar (Merck, Germany) ทำการบ่มในตู้บ่มแบบควบคุมอุณหภูมิ (Contherm, Germany) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ รายงานผลเป็นค่าความต่างระหว่างปริมาณเชื้อตั้งต้นและปริมาณเชื้อเหลือรอดหลังการล้าง (BW-AW) มีหน่วยเป็น $\log_{10}$ cfu.g⁻¹

2. ผลของชนิดและอัตราส่วนของของสารละลายเกลืออินทรีย์และสารละลายเกลืออินทรีย์ผสมต่อการลดปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคบนกะหล่ำปลีหั่นฝอย

ทำการทดสอบผลของสารละลาย nL1.5 nC1.5 nLC11 nLC12 และ nLC21 ในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในกะหล่ำปลีหั่นฝอยหลังการล้าง โดยทำการเปรียบเทียบปริมาณ *Escherichia coli* ATCC 25922 *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 บนกะหล่ำปลีหั่นฝอยก่อนและหลังการทดสอบล้างด้วยสารละลาย ทำการปลูกถ่ายเซลล์แขวนลอยลงบนตัวอย่างกะหล่ำปลีหั่นฝอยด้วยวิธีการเช่นเดียวกันกับที่อธิบายไว้ในหัวข้อ 1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การศึกษาผลของชนิดและอัตราส่วนของสารละลายกรดและเกลืออินทรีย์ผสมในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคบนกะหล่ำปลีหั่นฝอยระหว่างการเก็บรักษา

1. ผลของชนิดและอัตราส่วนของของสารละลายกรดและกรดอินทรีย์ผสมในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคบนกะหล่ำปลีหั่นฝอยระหว่างการเก็บรักษา

1.1 ผลของสารละลาย L1.5 C1.5 LC11 LC12 และ LC21 ต่อการควบคุมการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922 *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 บนกะหล่ำปลีหั่นฝอยในระหว่างการเก็บรักษา ทำการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ก่อโรคลงบนกะหล่ำปลีหั่นฝอย หลังจากทีกะหล่ำปลีหั่นฝอยถูกทิ้งให้สะเด็ดน้ำเป็นเวลา 5 นาที ทำการบรรจุตัวอย่างลงในถุง stomacher bag ถุงละ 25 กรัม นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง ในวันที่ 0 1 2 3 4 และ 5 ทำการวิเคราะห์ปริมาณ *E. coli* ATCC 25922 *S. typhimurium* ATCC 13311 และ *S. aureus* ATCC 25923 ด้วยเทคนิคเปอร์ดเพลท โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแบ่งแยกและคัดเลือก รายงานผลเป็นค่าลอการิทึมของอัตราส่วนของปริมาณเชื้อเหลือรอดเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้น ($\log N/N_0$)

1.2 ค่า pH (ค่าความเป็นกรด-ด่าง) (AOAC, 1990) โดยนำตัวอย่างกะหล่ำปลีหั่นฝอยมาปั่นด้วยเครื่องตีปั่น (Seward, USA) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการตีปั่นมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำของเหลวที่กรองได้มาแบ่งใส่ปิ๊งเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 3 ปิ๊งเกอร์ ปิ๊งเกอร์ละ 5–10 มิลลิลิตร นำของเหลวในปิ๊งเกอร์ทั้ง 3 มาวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH Meter (Consort, Belgium) บันทึกค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างที่วัดได้ทั้ง 3 ซ้ำ ทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง ในวันที่ 0 1 2 3 4 และ 5

1.3 ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (Titratable acidity ; TA) (AOAC, 1990) โดยนำตัวอย่างกะหล่ำปลีหั่นฝอยตัวอย่างละ 50 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาปั่นด้วยเครื่องตีปั่น (Seward, USA) เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการตีปั่นมากรองด้วยกระดาษกรอง

เบอร์ 4 ปีเปิดของเหลวที่ได้มา 10 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ หยดสารละลาย phenolphthalein 3 หยด จากนั้นนำมาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐานความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนถึงจุดยุติ (สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู) บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐานความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ใช้มาคำนวณปริมาตรกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติก ทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง ในวันที่ 0 1 2 3 4 และ 5

2. ผลของชนิดและอัตราส่วนของของสารละลายเกลือและเกลืออินทรีย์ผสมในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคบนกะหล่ำปลีหั่นฝอยระหว่างการเก็บรักษา

ทำการทดสอบผลของสารละลาย nL1.5 nC1.5 nLC11 nLC12 และ nLC21 ต่อการควบคุมการเจริญของ *Escherichia coli* ATCC 25922 *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 บนกะหล่ำปลีหั่นฝอยในระหว่างการเก็บรักษา ทำการปลูกถ่ายจุลินทรีย์ก่อโรคลงบนกะหล่ำปลีหั่นฝอย หลังจากที่จะกะหล่ำปลีหั่นฝอยถูกทิ้งให้สะเด็ดน้ำเป็นเวลา 5 นาที ทำการบรรจุตัวอย่างลงในถุง stomacher bag ถุงละ 25 กรัม นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง ในวันที่ 0 1 2 3 4 และ 5 ทำการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรค ค่า pH และปริมาณกรดที่ไตเตรทได้ ดังอธิบายไว้ในข้อ 7.1.1 7.1.2 และ 7.1.3

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองถูกนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05