

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

วัสดุ

1. นมพาสเจอร์ไรซ์ และ โยเกิร์ต จำนวน 30 ผลิตภัณฑ์ ได้แก่
นมพาสเจอร์ไรซ์ ตราโฟร์โมสต์

- 1.1 นมสด
- 1.2 นมสดไขมันต่ำ
- 1.3 นมรสหวาน
- 1.4 นมรสช็อกโกแลต
- 1.5 นมรสกล้วยหอม
- 1.6 นมรสสตอเบอรี่
- 1.7 นมรสสกาแฟ
- 1.8 นมรสใบเตย

นมพาสเจอร์ไรซ์ ตราสหกรณ์ เชียงใหม่

- 1.9 นมสด
- 1.10 นมรสหวาน
- 1.11 นมรสช็อกโกแลต
- 1.12 นมรสสตอเบอรี่

นมพาสเจอร์ไรซ์ ตราเมจิ

- 1.13 นมสด
- 1.14 นมสดแคลเซียมสูง-ไขมันต่ำ
- 1.15 นมรสหวาน
- 1.16 นมรสโกโก้
- 1.17 นมรสช็อกโกแลต-มอลต์
- 1.18 นมสดขาดมันเนย
- 1.19 นมรสกาแฟ
- 1.20 นมรสสตอเบอรี่

โยเกิร์ตพร้อมดื่ม คราค์ชนิดส์

- 1.21 รสสตรอเบอร์รี่
- 1.22 รสส้ม
- 1.23 รสบลูเบอร์รี่
- 1.24 รสผลไม้รวม
- 1.25 รสผสมวันมะพร้าว

โยเกิร์ตพร้อมดื่ม คราโฟรโมสต์

- 1.26 รสสตรอเบอร์รี่
- 1.27 รสส้ม
- 1.28 รสผลไม้รวม
- 1.29 รสมิक्सเบอร์รี่
- 1.30 รสบลูเบอร์รี่

2. รอยัลเซลล์ ซึ่งได้จากผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ที่กินน้ำหวานของดอกไม้ขรรค์ (ดอกไม้ป่า) เป็นหลัก จากสุภาพาร์มผึ้ง อ.แมร์ม ค. แมร์มใต้ จ. เชียงใหม่ จำนวน

3 รูปแบบ (รูป 11) ได้แก่

- 2.1 แบบสด
- 2.2 แบบแช่เยือกแข็ง
- 2.3 แบบแคปซูล



รูป 11 รอยัลเซลล์แบบสด แบบแช่เยือกแข็ง และแบบแคปซูล

อุปกรณ์

1. จานเพาะเชื้อ (petri dish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 cm
2. หลอดทดลองฝาเกลียว (test tube) ขนาด 16 x 100 mm
3. หลอดดัดก๊าช (durham tube)
4. ขวดแก้วฝาเกลียว (vial ขนาด 5 และ 15 cc)
5. ขวดแก้วสีชา ขนาด 5 cc
6. ที่วางหลอดทดลอง (rack)
7. บีกเกอร์ (beaker)
8. ขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 500 และ 1,000 ml
9. กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 10 50 100 และ 1,000 ml
10. ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 250 ml
11. ปิเปต (pipette) ขนาด 1 และ 10 ml
12. auto pipette ขนาด 10-100 และ 100-1,000 μ l
13. tip ตามขนาด auto pipette
14. แท่งแก้วคน (stirrer)
15. หลอดหยด (dropper)
16. ช้อนตักสาร (spatula)
17. ปากคีบ (forceps)
18. กรวยแก้ว (funnel)
19. เข็มเย็บเชื้อ (needle)
20. หัวง่ายเชื้อ (loop)
21. แท่งแก้วสามเหลี่ยมแบบมีด้าม (spreader)
22. ที่เจาะจุกคอร์ค (cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm)
23. มีดผ่าตัด
24. ตะเกียงแอลกอฮอล์
25. สไลด์ (slide)
26. กระจกปิดสไลด์ (cover slips)
27. stage micrometer
28. ocular micrometer
29. แท่งแก้วรูปตัว V

30. ไม้บรรทัด
31. สำลี
32. paraffin film
33. กระดาษอลูมิเนียม (aluminium foil)
34. กระดาษขังสาร
35. กระดาษซับ
36. กระดาษวัด pH
37. กระดาษกรอง (filter paper) เบอร์ 1
38. ถูพลาสติก
39. หนัวยาง
40. ผ้าขาวบาง

เครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope) ยี่ห้อ Olympus
2. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope) ยี่ห้อ Olympus
3. สไลด์สำหรับนับจำนวนจุลินทรีย์ (haemocytometer)
4. เครื่องนับจำนวน (counter)
5. กล้องถ่ายภาพ ยี่ห้อ Nikon
6. เครื่องวัด pH ยี่ห้อ Horiba
7. หม้อนึ่งความดัน (autoclave) ยี่ห้อ Tommy
8. ตู้ถ่ายเชื้อ (lamina flow) ยี่ห้อ Gelman sciences
9. เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างหยาบ (2 ตำแหน่ง) ยี่ห้อ Sartorius
10. เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียด (3 ตำแหน่ง) ยี่ห้อ Sartorius
11. ตู้อบ (hot air oven) ยี่ห้อ Heraeus
12. ตู้บ่มเชื้อปรับอุณหภูมิ 25°C ยี่ห้อ Termaks
13. ตู้บ่มเชื้อปรับอุณหภูมิ 30°C ยี่ห้อ Memmert
14. ตู้เย็นเก็บสารเคมี และ stock culture ยี่ห้อ Sanyo
15. ไมโครเวฟ (microwave) ยี่ห้อ Sharp

สารเคมี (ภาคผนวก ก)

1. Crystal violet solution
2. Gram iodine solution
3. Decolourizer
4. Safranin O solution
5. Malachite green solution
6. 3% Hydrogen peroxide solution
7. Kovac ' s solution
8. Methyl red solution
9. Nitrate test solution
10. Voges-Proskauer test solution

อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ข)

1. Nutrient agar
2. Potato dextrose agar
3. Motility test medium
4. Nitrate broth
5. Nutrient gelatin medium
6. Tryptone broth
7. MR - VP medium
8. Simmon ' s citrate agar
9. Malonate broth
10. TSI agar
11. Fermentation Carbohydrate medium
12. Aesculin hydrolysis

วิธีการวิจัย

1. การแยกและรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์

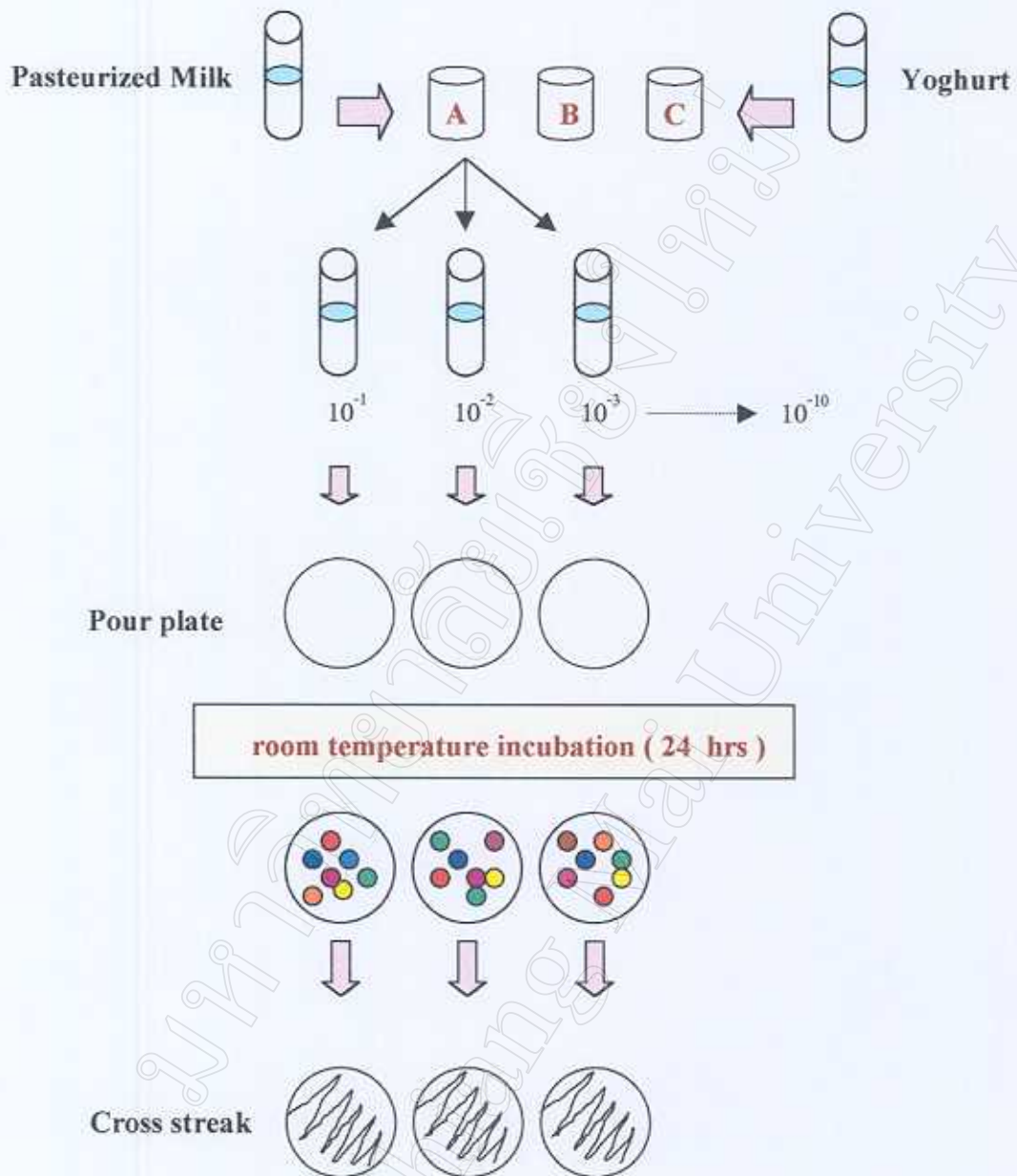
จาก stock culture ของเชื้อก่อปัญหาในนมที่ทราบชนิดแล้ว

ใช้เชื้อจากสาขาจุลชีววิทยา ภาคชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 7 สปีชีส์ ได้แก่

- 1) *Bacillus cereus*
- 2) *Bacillus subtilis*
- 3) *Escherichia coli*
- 4) *Enterobacter aerogenes*
- 5) *Micrococcus luteus*
- 6) *Staphylococcus aureus*
- 7) *Salmonella* sp.

จากนมพาสเจอร์ไรซ์และโยเกิร์ต

- 1.1 สุ่มเก็บตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์และโยเกิร์ต จากร้านค้าต่าง ๆ จำนวน 30 ผลิตภัณฑ์ โดยเก็บผลิตภัณฑ์ละ 3 ตัวอย่าง
- 1.2 แบ่งผลิตภัณฑ์เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่
 - 1) ยังไม่หมดอายุ
 - 2) หมดอายุแล้ว
 - 3) เปิดตั้งทิ้งไว้
- 1.3 แยกเชื้อโดยวิธี dilution pour plate (รูป 12)
 - 1.3.1 นำตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรซ์และโยเกิร์ตมาทำ suspension โดยใช้ pipette ดูดตัวอย่างนม 1 ml ใส่ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 9 ml ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16 x 100 ml เขย่าให้เข้ากัน
 - 1.3.2 เจือจาง suspension ตัวอย่างนมจากข้อ 1.3.1 ที่ละ 10 เท่า จนได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-1} ถึง 10^{-10}
 - 1.3.3 ตรวจสอบแบคทีเรีย โดยใช้ pipette ดูด suspension ของตัวอย่างนม ระดับความเจือจางละ 0.1 ml ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ แล้วเทอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) ลงไป รีบปิดฝา และหมุนจานเพาะเชื้อไปมาเพื่อให้เชื้อกระจายทั่ว ทั้งให้อาหารแข็งตัวแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
 - 1.3.4 ตรวจสอบราและยีสต์ ตามข้อ 1.3.3 แต่เปลี่ยนเป็นอาหาร potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง



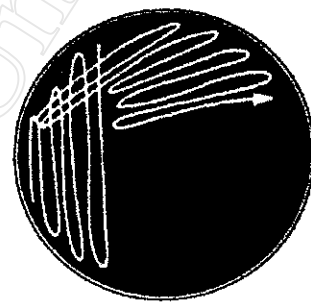
รูป 12 ขั้นตอนการแยกเชื้อจากนมพาสเจอร์ไรซ์และ โยเกิร์ต

1.4 แยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธี cross streak plate

- 1.4.1 ใช้ loop เขี่ยเชื้อมาแตะที่ผิววุ้นตรงขอบของจานเพาะเชื้อ ลากไปมาบนผิววุ้น 4-5 เส้น แล้วปิดฝาจาน
- 1.4.2 เผลา loop ให้แดงเพื่อฆ่าเชื้อ ปลอຍให้เย็นในอากาศ
- 1.4.3 ลากครั้งที่ 2 โดยใช้ loop ลากผ่านเชื้อที่แตะไว้ครั้งแรก ลากไป มา 5-6 เส้นให้ ไกลกันที่สุด
- 1.4.4 ทำเช่นเดียวกันในครั้งที่ 3 และ 4 โดยไม่ต้องเผลา loop (รูป 13)
- 1.4.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง จนเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ ขนาดพอสะดวกในการแยก แล้วเขี่ยลงอาหาร NA slant



A



B



C



D

รูป 13 ทิศทางการแยกเชื้อด้วยเทคนิค cross streak

1.5 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

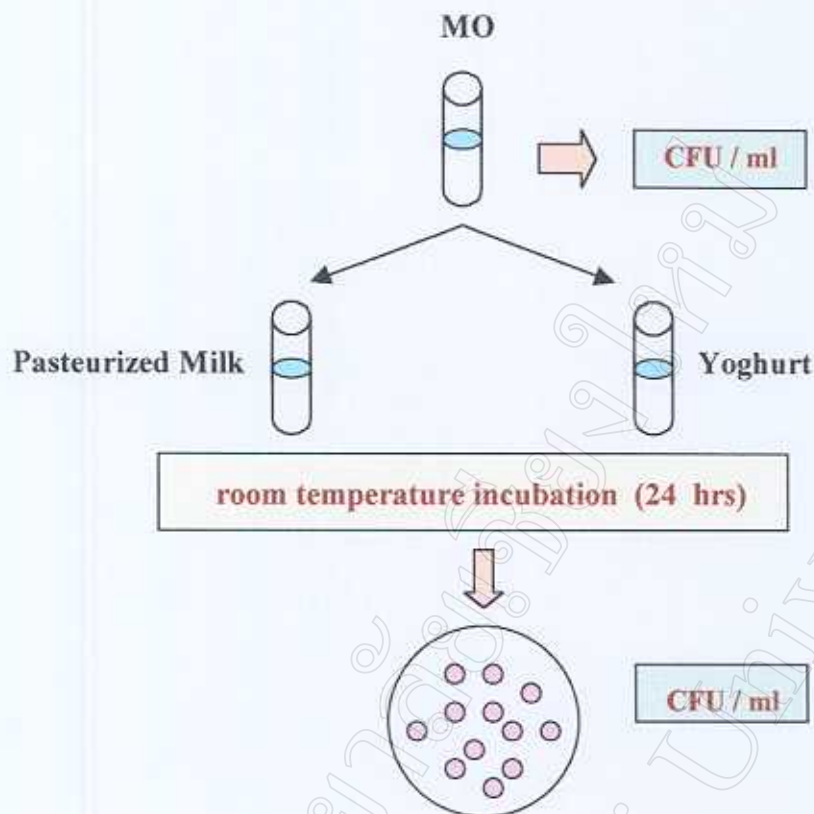
- 1.5.1 เก็บแบคทีเรียโดยเฉื่อยเชื้อลงในขวด vial ที่มีอาหาร tryptose broth (20% glycerol) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C
- 1.5.2 เก็บราโดยใช้ cork borer ขนาด 0.5 เซนติเมตร เจาะวุ้นที่มีเส้นใยเจริญอยู่ ลงในขวด vial ที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C

2. การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์

2.1 จำแนกชนิดของแบคทีเรีย ตาม Bergey ' s Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994)

- 2.1.1 ศึกษาด้วยตาเปล่า โดยเปรียบเทียบลักษณะรูปร่าง สี ขนาดและลักษณะการเจริญของโคโลนีแบคทีเรียบนอาหารวุ้น
- 2.1.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการสังเกตรูปร่าง ขนาด การจัดเรียงตัวของเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์ และจากการย้อมสีแบบกรัม (ภาคผนวก ค)
- 2.1.3 ตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีดังนี้ (ภาคผนวก ง)
 - 1) การทดสอบแคตาเลส (catalase test)
 - 2) การทดสอบออกซิเดส (oxidase test)
 - 3) การทดสอบ MR (methyl red test)
 - 4) การทดสอบ VP (Voges - Prokauer test)
 - 5) การทดสอบอินโดล (indole test)
 - 6) การทดสอบการใช้ซิเตรท (citrate utilization test)
 - 7) การทดสอบการใช้มาโลเนต (malonate utilization test)
 - 8) การทดสอบการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction test)
 - 9) การทดสอบการย่อยแป้ง (starch hydrolysis test)
 - 10) การทดสอบการย่อยเอस्कูลิน (esculin hydrolysis test)
 - 11) การทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction test)
 - 12) การทดสอบการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide (H₂S) production test)
 - 13) การทดสอบยูรีเอส (urease test)
 - 14) การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate fermentation test)
 - 15) การทดสอบการออกซิไดส์และการหมัก (oxidation-fermentation test)

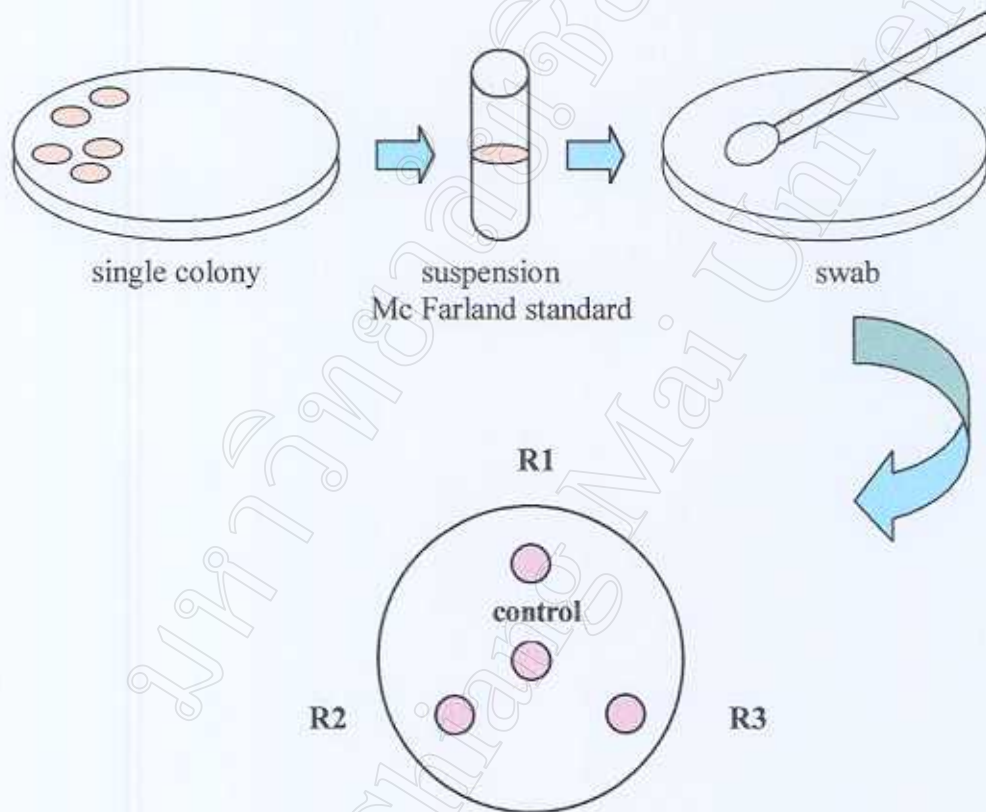
- 2.2 จำแนกชนิดของรา ตาม The Genera of Fungi Sporulating in Pure culture (von Arx, 1981)
 - 2.2.1 ศึกษาด้วยตาเปล่า โดยเปรียบเทียบรูปร่าง สี ขนาด และลักษณะการเจริญของโคโลนีเชื้อราที่อยู่บนอาหารแข็ง
 - 2.2.2 ศึกษาโครงสร้างต่าง ๆ ของเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ และแบบสเตอริโอ ด้วยเทคนิคการทำ slide culture (ภาคผนวก จ)
3. คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ก่อปัญหาและเพิ่มจำนวนได้ในนมพาสเจอร์ไรซ์และโยเกิร์ต (รูป 14) โดยวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ factorial in completely randomized design และ Duncan 's new multiple range test ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ดังนี้
 - 3.1 เลี้ยงแบคทีเรียบนอาหาร NA ส่วนราเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง
 - 3.2 เตรียม suspension ของจุลินทรีย์ โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเจือจาง ให้แบคทีเรีย และยีสต์ มีความเข้มข้นเท่ากับ Mc Farland standard (ภาคผนวก จ) เบอร์ 0.5 (ประมาณ 1.5×10^8 cell / ml) และนับสปอร์ราให้ได้ประมาณ 1×10^8 spores / ml
 - 3.3 นำตัวแทนนมพาสเจอร์ไรซ์และโยเกิร์ตที่ยังไม่หมดอายุ ใส่ในหลอดทดลอง หลอดละ 10 ml ตรวจสอบลักษณะ สี กลิ่น และ pH ตั้งคั่น
 - 3.4 เติมน้ำ suspension ของจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ หลอดละ 10 μ l (ใช้หลอดที่ไม่ได้เติมเชื้อเป็นชุดควบคุม)
 - 3.5 นับจำนวนเซลล์ตั้งคั่น โดยวิธี dilution spread plate เทียบกับการนับจำนวนด้วย haemocytometer รายงานผลเป็น colony forming unit (CFU / ml)
 - 3.6 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
 - 3.7 ตรวจสอบลักษณะ สี กลิ่น pH และดูว่าจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนหรือไม่เมื่อเทียบกับชุดควบคุม โดยวิธี dilution spread plate เทียบกับการนับจำนวนด้วย haemocytometer รายงานผลเป็น colony forming unit (CFU / ml)
 - 3.8 เลือกจุลินทรีย์ที่ก่อปัญหาและเพิ่มจำนวนได้ ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป



รูป 14 ขั้นตอนการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เพิ่มจำนวนได้ในนมพาสเจอร์ไรซ์และโยเกิร์ต

4. ทดสอบผลของรอยัลเซลล์ต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในนมพาสเจอร์ไรซ์และโยเกิร์ต โดยใช้รอยัลเซลล์ 3 แบบ คือ แบบสด แบบแช่แข็ง และแบบแคปซูล ซึ่งได้จากฝักรักน้ำหวานของคอกโมรบาบักษ์เป็นหลัก จากสุภาพาร์มฝักรัก อ. เมธิม จ. เชียงใหม่ โดยวิธี paper disc diffusion วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ factorial in completely randomized design และ Duncan ' s new multiple rang test ทำการทดลอง 3 ซ้ำ มีขั้นตอนดังนี้
 - 4.1 เตรียม suspension ของจุลินทรีย์ โดยใช้กากถั่วเป็นตัวเจือจาง ให้แบคทีเรีย และยีสต์ มีความเข้มข้นเท่ากับ Mc Farland standard เบอร์ 0.5 (ประมาณ 1.5×10^8 cell / ml) และนับสปอร์ราให้ได้ประมาณ 1×10^8 spores / ml
 - 4.2 เตรียม suspension ของรอยัลเซลล์ทั้ง 3 รูปแบบ ที่ความเข้มข้น 200 mg / ml โดยใช้กากถั่วมาเชื้อเป็นตัวเจือจาง
 - 4.3 จุ่ม cotton swab ใน suspension ของจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ แล้วนำมา streak ให้ทั่วผิวน้ำอาหาร NA สำหรับแบคทีเรีย และอาหาร PDA สำหรับยีสต์และรา ทั้งไว้ประมาณ 3-5 นาที

- 4.4 ใช้ปิเปตหยด suspension ของรอยัลเซลล์ลี ปริมาณ 8 μ l ลงบน filter paper disc ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร
- 4.5 ใช้ forceps คีบ filter paper disc ที่หยด suspension ของรอยัลเซลล์ลีแล้ว นำไปวางบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูป 15) จากข้อ 4.3
- 4.6 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง
- 4.7 วัด inhibition zone โดยวัดรวมเส้นผ่าศูนย์กลางของ filter paper disc ด้วย
- 4.8 เลือกเชื้อที่รอยัลเซลล์ลีสามารถยับยั้งการเจริญได้ ไว้ทดสอบขั้นต่อไป



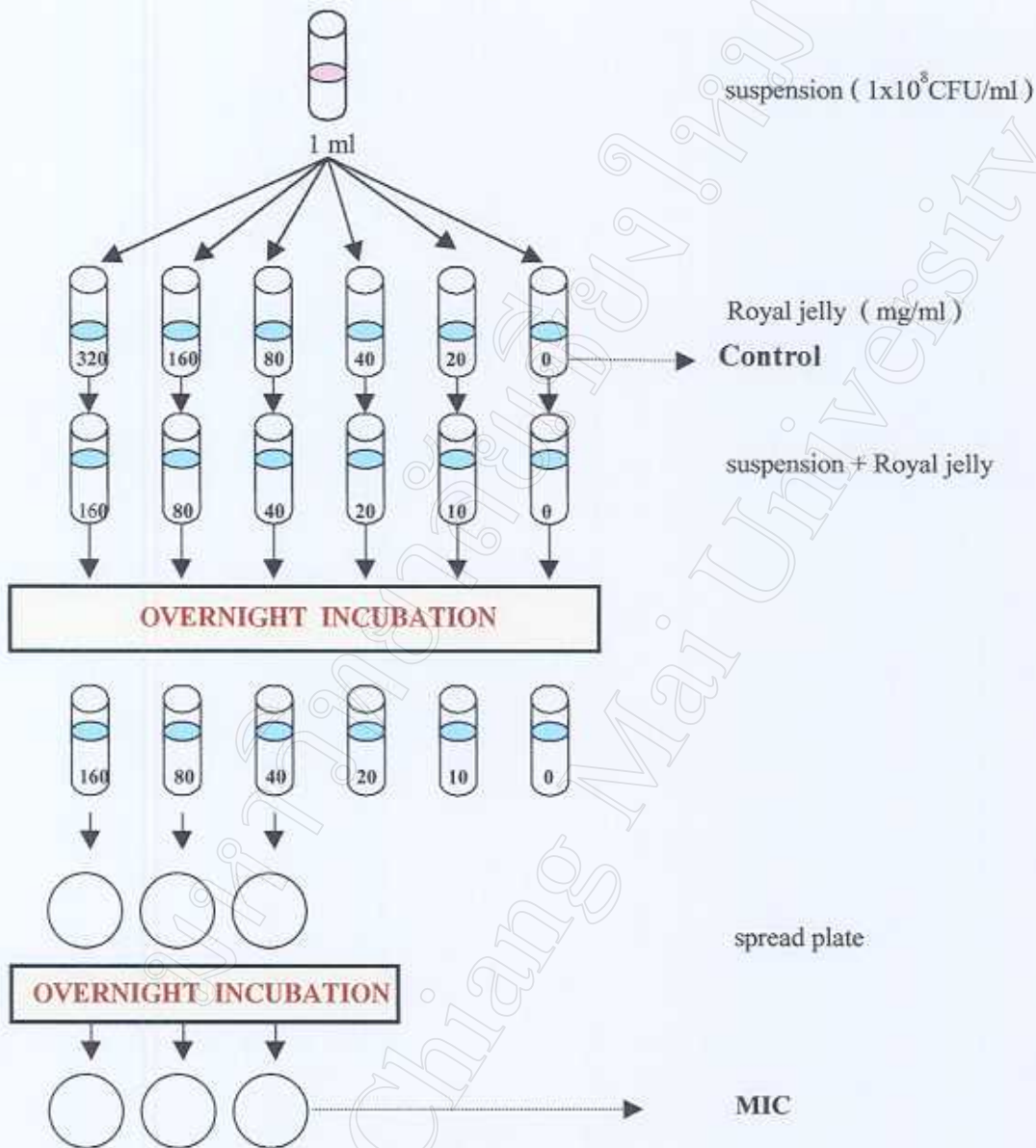
รูป 15 ขั้นตอนการทำ paper disc diffusion และตำแหน่งการวาง disc

หมายเหตุ

- control = น้ำกลั่น
- R_1 = รอยัลเซลล์ลีแบบสด
- R_2 = รอยัลเซลล์ลีแบบแช่แข็ง
- R_3 = รอยัลเซลล์ลีแบบแคปซูล

5. หาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของรอยัลเซลล์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ (minimum inhibitory concentration, MIC) โดยใช้วิธี dilution susceptibility (รูป 16) วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ factorial in completely randomized design และ duncan ' s new multiple rang test ทำการทดลอง 3 ซ้ำ มีขั้นตอนดังนี้
 - 5.1 เตรียม suspension ของจุลินทรีย์ที่รอยัลเซลล์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ จากข้อ 4.8 โดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร NB ให้มีความขุ่นเท่ากับ Mc Farland standard เบอร์ 0.5 (ประมาณ 1.5×10^8 cell / ml) และนับสปอร์ราให้ได้ประมาณ 1×10^8 spores / ml ในอาหาร PDB
 - 5.2 เตรียม suspension ของรอยัลเซลล์ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 80, 160 และ 320 mg / ml ในอาหาร NB และ PDB
 - 5.3 เติม suspension ของจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ ลงในอาหาร NB และ PDB หลอดละ 1 ml จะได้ suspension ของรอยัลเซลล์ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 40, 80 และ 160 mg / ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
 - 5.4 นับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธี spread plate รายงานผลเป็น CFU / ml
 - 5.5 เปลี่ยนระดับความเข้มข้นของรอยัลเซลล์ และทดสอบตามลำดับขั้นต้น จนได้ค่า MIC
6. หาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของรอยัลเซลล์ที่ใส่ในนมพาสเจอร์ไรซ์และโยเกิร์ตที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ (minimum inhibitory concentration, MIC) โดยใช้วิธี dilution susceptibility วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ factorial in completely randomized design และ Duncan ' s new multiple rang test ทำการทดลอง 3 ซ้ำ มีขั้นตอนดังนี้
 - 6.1 เตรียม suspension ของจุลินทรีย์ที่รอยัลเซลล์ยับยั้งการเจริญเติบโตได้จากข้อ 4.8
 - 6.2 นำตัวแทนนมพาสเจอร์ไรซ์และโยเกิร์ตที่ยังไม่หมักอายุ ใส่ในหลอดทดลองด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ หลอดละ 10 ml
 - 6.3 เตรียม suspension ของรอยัลเซลล์ให้มีความเข้มข้นที่ค่า MIC สูงสุดที่ยับยั้งจุลินทรีย์ทุกไอโซเลทที่ก่อปัญหาและเพิ่มจำนวนได้ในนมพาสเจอร์ไรซ์และโยเกิร์ต (ผลการทดลองจากข้อ 5.5)
 - 6.4 เติม suspension ของรอยัลเซลล์ที่เตรียมไว้ลงในหลอดทดลองจากข้อ 6.3
 - 6.5 เติม suspension ของจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ลงในตัวแทนนมพาสเจอร์ไรซ์และโยเกิร์ตที่มีและไม่มียอยัลเซลล์ หลอดละ 1 ml ปิดฝาให้สนิท
 - 6.6 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- 6.7 นับจำนวนจุลินทรีย์โคขวิธี spread plate เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่รอยัลเซลล์ลี
- 6.8 เปลี่ยนระดับความเข้มข้นของรอยัลเซลล์ลี และทดสอบตามลำดับขั้นต้นจนได้ค่า MIC



รูป 16 ขั้นตอนการหาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของรอยัลเซลล์ลีที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (MIC) โคขวิธี dilution susceptibility