

บทที่ 3

การวิจัยและการดำเนินงาน

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างเนื้อสุกรและแฮม

เนื้อสุกรและแฮมซื้อจากตลาดหัวตะเข้ ตลาดหน้านิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง ตลาดพระโขนง ตลาดลานบุญ ตลาดมีนบุรี ร้านขายของชำ และซูเปอร์มาร์เก็ตในกรุงเทพมหานคร ชนิดละ 30 ตัวอย่าง ระหว่างเดือน ส.ค. - ต.ค. พ.ศ. 2548

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ *Staphylococcus aureus* SAP 17971/05 และ *Salmonella* Rissen SAP 08946/02 ที่แยกได้จากแฮม *Salmonella* Typhimurium SAP 08957/02 แยกได้จากเนื้อสุกรสด *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Yersinia enterocolitica* DMST 9380, *Escherichia coli* DMST 4212, *Vibrio parahaemolyticus* DMST 21243 และ *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076 ได้มาจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายที่ใช้ทำเจือจาง และสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ได้แก่ Tryptic Soy Broth/ Tryptic Soy Agar (TSB/ TSA, พีเอช 7.3 ± 0.2 , Difco), Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD, พีเอช 7.4 ± 0.2 , Difco), Cooked meat medium (CM, Mast Diagnostic), Brain Heart Infusion (BHI, พีเอช 7.4 ± 0.2 , Difco), Lauryl Tryptose Broth (LST, พีเอช 6.8 ± 0.2 , Difco), Braid-Parker Agar base (BP, Scharlau), EC Medium (EC, พีเอช 6.9 ± 0.2 , Difco), Rappaport-Vassiliadis R10 Broth (RV, พีเอช 5.1 ± 0.2 , Difco), Rappaport-Vassiliadis medium (MSRV, Difco), Tetrathionate broth base (TT, พีเอช 6.4 ± 0.2 , Scharlau), Triple Sugar Iron Agar (TSI, พีเอช 7.4 ± 0.2 , Difco), MIL medium (LIM, Difco), fluid thioglycolate medium (Merck), Eosin-methylene blue agar (EMB agar, Scharlau), Plate Count Agar (PCA), acidified Potato Dextrose Agar (acidified PDA, พีเอช 4.5), MR-VP broth, Koser's citrate broth, Tryptone broth, Modified BHI-EY medium agar (modified BHI, พีเอช 7.6), Lactose Broth (LB, พีเอช 6.9 ± 0.2), Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB) Mueller Hinton broth (MHB, พีเอช 7.3 ± 0.1 , Difco) และ Iron milk medium (modified)

สารละลายที่ใช้ทำเชื้อจางและสารเคมี ได้แก่ สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบต สารละลายโซเดียมอะซิเตต สารละลายโซเดียมแลคเตต เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95 คริสตัลไวโอเลต แกรมไอโอดีน ซาฟรานินโอ กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ ได้แก่ สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 40 สารละลายแอลฟาแนฟтол ครีเอทีน (creatine) น้ำเลือดกระต่าย (rabbit plasma), Kovacs' reagent, Voges-Proskauer (VP) reagents และเมทิลเรด (Methyl red)

3.1.4 เครื่องมือ

เครื่องมือที่ใช้ ได้แก่ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (Autoclave) บริษัท Tomy รุ่น SS-325 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) บริษัท Harmle รุ่น Z383K ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow) บริษัท Astec Microflow รุ่น ABS 1200 เครื่องตีปั่น (Stomacher) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) บริษัท Cyberscan รุ่น 2000 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) บริษัท Memmert เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (iEMS Reader MF, Labsystems) เครื่องวัดค่า water activity (a_w) Novasina thermoconstanter รุ่น TH 200 และอุปกรณ์อื่นๆที่จำเป็น

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อสุกรและแฮมที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร

3.2.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเนื้อสุกรและแฮม ชนิดละ 30 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 200 กรัม จากตลาด ร้านขายของชำ และซูเปอร์มาเก็ต ในกรุงเทพมหานคร แล้วนำมาวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ภายใน 6 ชั่วโมง

3.2.1.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ในเนื้อสุกร

ทำการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ ที่กำหนดโดยมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ มกอช.6000-2547 เกี่ยวกับมาตรฐานเนื้อสุกร โดยสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด แบคทีเรียโคลิฟอร์ม *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* โดยใช้วิธีการตาม BAM (Bacteriological Analytical Manual) Online. 2002

3.2.1.3 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ในแฮม

วิเคราะห์จุลินทรีย์ที่กำหนดตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน มพช. 145/2546 เกี่ยวกับมาตรฐานของแฮม โดยสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์และรา *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium*

perfringens และ *Escherichia coli* โดยใช้วิธีการตาม BAM (Bacteriological Analytical Manual) Online. 2002

3.2.1.4 การวัดค่าพีเอชและค่า water activity (a_w) ของเนื้อสุกรและแฮม

วัดค่าพีเอชของเนื้อสุกรและแฮมด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) ส่วนการวัดค่า water activity (a_w) ของเนื้อสุกรและแฮม ทำได้โดยตัดเนื้อสุกรและแฮมให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในถ้วยสำหรับวัดค่า a_w แล้วนำไปวัดค่า a_w ด้วยเครื่องวัด a_w

3.2.2 การศึกษาผลของสารละลายโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียม

ซอร์เบตต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่างๆ โดยการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (Minimum Inhibitory Concentration; MIC) ด้วยวิธี microtitre plate broth dilution

3.2.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

ทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Rissen, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Escherichia coli* ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ลงในหลอดอาหาร TSA หลอดใหม่แต่ละหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *P. fluorescens* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นถ่ายเชื้ออีก 2 ครั้ง นำไปบ่มในสถานะเดิม แล้วเขี่ยเชื้อมาลากบนจานอาหาร TSA ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ นำไปบ่มที่สถานะเดิม จากนั้นเขี่ยเชื้อที่เจริญบนผิวหน้าอาหารจำนวน 3-5 โคโลนี ลงในอาหาร TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ยกเว้น *P. fluorescens* นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และทำให้เซลล์อยู่ในรูปสารแขวนลอยโดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงไป จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดไปปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 2 จะได้เชื้อเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และตรวจนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นด้วยเทคนิค spread plate บนอาหาร TSA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.2.2 การหาค่า MIC ของสารละลายโซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบตในสถานะที่มีค่าพีเอชต่างๆ

การหาค่า MIC ของสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ 3 ชนิด ได้แก่ โซเดียมแลคเตต โซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบต ในอาหาร MHB ที่มีค่าพีเอชต่างกัน 6 ระดับ คือ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ในการยับยั้งแบคทีเรียทั้งหมด 8 ชนิด โดยใช้เทคนิคการเจือจางด้วยวิธี

ของ Nanasombat และ Lohasupthawee (2005) โดยปิเปตอาหาร MHB ที่แต่ละค่าพีเอชปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุมของ microtiter plate (96 หลุม) จากนั้นปิเปตสารละลายเกลือโซเดียม แคลเซียม ความเข้มข้น 459 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่ 1 ของแต่ละ แถว (แถว A-F) ที่ใส่อาหาร MHB ไว้แล้ว ทำการเจือจาง 2 เท่า (two-fold serial dilution) โดยผสม ให้เข้ากันแล้วปิเปตสารละลายในหลุมขึ้นมา 100 ไมโครลิตร นำไปใส่ลงในหลุมที่อยู่ถัดมาตาม แนวอน (หลุมที่ 2) แล้วผสมให้เข้ากันก่อนจะปิเปตไปใส่ในหลุมต่อไป ทำเช่นเดียวกันนี้ไปจนถึง หลุมสุดท้าย (หลุมที่ 12) แล้วจึงปิเปตสารละลายในหลุมสุดท้ายทิ้งไป 100 ไมโครลิตร ซึ่งจะทำให้ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมแคลเซียมในแต่ละหลุมเจือจางลดลง 2 เท่า ไปเรื่อยๆจนถึงหลุม สุดท้าย จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยของแบคทีเรียแต่ละชนิด ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในทุก หลุมจะได้ระดับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมแคลเซียมเป็น 191.25, 95.62, 47.83, 23.92, 11.96, 5.98, 3.00, 1.50, 0.75, 0.38, 0.19 และ 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปวัดความขุ่นก่อน บ่มด้วยเครื่อง microplate reader (iEMS Reader MF, Labsystems) ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาวัดการเจริญของ เชื้อโดยวัดจากค่าความขุ่นในแต่ละหลุม ซึ่งความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำให้ค่าความขุ่นไม่เปลี่ยน แปลง แสดงว่าไม่มีการเจริญของเชื้อและนั่นคือค่า MIC ของสารนั้น ส่วนการทดลองหาค่า MIC ของสารละลายโซเดียมอะซิเตต และโพแทสเซียมซอร์เบต ก็ทำด้วยวิธีการเดียวกันนี้แต่ใช้ สารละลายโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้นเริ่มต้น 504 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะไ้ระดับความ เข้มข้นของสารละลายโซเดียมอะซิเตตเป็น 210, 105, 52.5, 26.25, 13.12, 5.57, 3.28, 1.64, 0.82, 0.41, 0.20, และ 0.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้สารละลายโพแทสเซียมซอร์เบตความเข้มข้น เริ่มต้น 615.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะไ้ระดับความเข้มข้นของสารละลายโพแทสเซียม ซอร์เบตเป็น 256.34, 128.17, 64.08, 32.04, 16.02, 8.01, 4.00, 2.00, 1.00, 0.50, 0.25 และ 0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2.3 การศึกษาผลของเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลาย ต่อการ รอดชีวิตของ *Salmonella Rissen* และ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสุกร

3.2.3.1 การเตรียมเนื้อสุกร

นำเนื้อสุกร 1 กิโลกรัม มาล้างให้สะอาด ใช้มีดปลอดเชื้อหั่นเนื้อสุกรให้เป็นชิ้นเล็กลง แล้วนำไปลวกในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที (Nissen และคณะ. 2001) นำมาผึ่งให้แห้งในตู้ปลอดเชื้อเป็นเวลา 30 นาที

3.2.3.2 การเตรียมเชื้อ *Salmonella Rissen* และ *Staphylococcus aureus*

ทำการเตรียมเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.1

3.2.3.3 การยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* Rissen และ *Staphylococcus aureus* โดยใช้สารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ร่วมกับการแช่แข็งและการทำให้ละลาย

นำเนื้อสุกที่เตรียมไว้ส่วนหนึ่งนำมาเติมสารแขวนลอยของเชื้อ *S. Rissen* และอีกส่วนหนึ่งนำมาเติมสารแขวนลอยของเชื้อ *S. aureus* เพื่อให้เชื้อมีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^7 เซลล์ต่อกรัม ตามวิธีการของ Jung และ Beuchat (1999) จากนั้นทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบการอยู่รอดของเชื้อทั้งสองชนิดในเนื้อสุกที่ผ่านการเติมเกลือของกรดอินทรีย์ต่างชนิดกันจำนวน 3 ชนิด รวมทั้งในเนื้อสุกที่ไม่มีการเติมเกลือชนิดใดๆ (ชุดควบคุม) และผ่านการแช่แข็งและการทำให้ละลาย โดยในขั้นตอนการทดลองได้แบ่งเนื้อสุกที่เติมเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดออกเป็น 4 ส่วนย่อย นำแต่ละส่วนมาเติมสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของเกลือชนิดนั้น ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อชนิดที่เติมลงไป เมื่อพีเอชเท่ากับ 5.5 ที่ได้จากข้อ 3.2.2.2 ดังนี้ ส่วนที่ 1) เติมน้ำเกลือโซเดียมแลคเตต ส่วนที่ 2) เติมน้ำเกลือโซเดียมอะซิเตต ส่วนที่ 3) เติมน้ำเกลือโพแทสเซียมซอร์เบต และส่วนที่ 4) ชุดควบคุม ไม่มีการเติมสารละลายเกลือของกรดอินทรีย์ แล้วตรวจหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เติม (*S. Rissen* หรือ *S. aureus*) ในเนื้อสุกทั้ง 4 ส่วน ก่อนนำไปแช่แข็ง จากนั้นนำเนื้อสุกไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -23 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำออกมาทำให้ละลายอย่างช้าที่อุณหภูมิ 5 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจนับจำนวนเซลล์ทั้งหมด (เซลล์แข็งแรงและเซลล์บาดเจ็บ) ของ *S. Rissen* และ *S. aureus* ที่มีชีวิตด้วยเทคนิค spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA และจำนวนเซลล์แข็งแรงของ *S. Rissen* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD และเซลล์แข็งแรงของ *S. aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BPA หลังผ่านการแช่แข็งนาน 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ คำนวณหาปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตทั้งหมด โดยปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตร้อยละ 100 แทนจำนวนเซลล์ทั้งหมดในเนื้อสุกก่อนการเติมเกลือของกรดอินทรีย์ การแช่แข็ง และทำให้ละลาย รวมทั้งคำนวณหาปริมาณเซลล์บาดเจ็บและเซลล์ตายของ *S. Rissen* และ *S. aureus* การคำนวณทำได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตทั้งหมด (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบน TSA หลังแช่แข็ง} \times 100}{\text{จำนวนโคโลนีบน TSA ก่อนแช่แข็ง}}$$

$$\text{ปริมาณเซลล์บาดเจ็บ (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบน TSA} - \text{จำนวนโคโลนีบน XLD} \times 100}{\text{หรือ BPA}}$$

$$\text{ปริมาณเซลล์ที่ตาย (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีบน TSA} - \text{จำนวนโคโลนีบน TSA}}{\text{ก่อนแช่แข็ง} \quad \text{(หลังแช่แข็ง)} \times 100}$$

จำนวนโคโลนีบน TSA ก่อนแช่แข็ง

3.2.3.4 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ CRD และนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้ง 3 ซ้ำ มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS และปริมาณจุลินทรีย์ (โคโลนีต่อกรัม) นำมาแปลงเป็นค่าร้อยละ ก่อนนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan Multiple Range Test