บทที่ 3
วิธีดำเนินการศึกษา

3.1 รูปแบบการศึกษา

เป็นการศึกษาเชิงสำรวจ (survey research) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณของจุลินทรีย์ จำนวน 6 ชนิด ในสลัดผักพร้อมบริโภค 2 ชนิด คือชนิดบรรจุถาดโฟมใช้พลาสติกใสห่อหุ้มมิดชิด และชนิดที่ผู้ขายตักให้ โดยเก็บตัวอย่างพร้อมกันจำนวน 5 ครั้ง ระหว่างวันที่ 18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2544 ถึง วันที่ 4 มกราคม พ.ศ. 2545

3.2 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

3.2.1 ขอบเขตของประชากร

ประชากร เป็นสลัดผักพร้อมบริโภคที่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้า เขตอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ และร้านอาหารในมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.2.2 ขอบเขตกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างใช้วิธีการเลือกกลุ่มตัวอย่างแบบไม่อาศัยความน่าจะเป็น(nonprobability) โดยการสุ่มตัวอย่างแบบเจาะจง (purposive sampling) (ภาควิชาประเมินผลและวิจัยการศึกษา, 2541) ได้กลุ่มตัวอย่างที่เป็นสลัดผักพร้อมบริโภค จำนวน 2 ชนิด ได้แก่

1) เป็นสลัดผักพร้อมบริโภคชนิดบรรจุถาดโฟมใช้พลาสติกใสห่อหุ้มมิดชิด จำนวน 1 ยี่ห้อ จากซุปเปอร์มาเก็ตของห้างสรรพสินค้า 5 แห่งในเขตอำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
2) เป็นสลัดผักพร้อมบริโภคชนิดที่ผู้ขายตักให้ จากร้านอาหารจำนวน 1 แห่ง ในมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.3 วิธีการเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างสลัดผักพร้อมบริโภคชนิดบรรจุถาดโฟมใช้พลาสติกใสห่อหุ้มมิดชิด และสลัดชนิดที่ผู้ขายตักให้ จากซุปเปอร์มาเก็ตในห้างสรรพสินค้า และร้านอาหารในมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งการเก็บตัวอย่างของสลัดผักพร้อมบริโภค ทั้งสองตัวอย่างนี้ จะเก็บไปพร้อมๆกัน ตัวอย่างละ 5 ครั้ง โดยกำหนดเวลาในการเก็บตัวอย่างดังนี้

ครั้งที่ 1 : เก็บวันที่ 18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2544
ครั้งที่ 2 : เก็บวันที่ 4 ธันวาคม พ.ศ. 2544
ครั้งที่ 3 : เก็บวันที่ 9 ธันวาคม พ.ศ. 2544
ครั้งที่ 4 : เก็บวันที่ 16 ธันวาคม พ.ศ. 2544
ครั้งที่ 5 : เก็บวันที่ 4 มกราคม พ.ศ. 2545

โดยแต่ละครั้งกำหนดส่วนประกอบของสลัด 2 อย่างคือ

3.3.1 ผักสด ซึ่งประกอบด้วย ผักกาดหอม แครอท แตงกวา และมะเขือเทศ รวมทั้งสิ้นหนักประมาณ 200 กรัม

3.3.2 น้ำสลัดมายองเนส หนักประมาณ 50 กรัม

สลัดพร้อมบริโภคทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะดังนี้

สลัดชนิดที่ 1 เป็นสลัดผักพร้อมบริโภคที่มีการบรรจุผักสลัดรวมกันในถาดโฟม(Ethene polystyrene) (มยุรี, 1995) ส่วนน้ำสลัดนั้นแยกใส่ถุงต่างหาก วางไว้บนผักสด แล้วหุ้มด้วยพลาสติกใส(low density polyethylene) (มยุรี, 1995) โดยทำการเก็บตัวอย่างสลัดหลัง การผลิตประมาณ 1 – 2 วัน ซึ่งผู้ผลิตมีการจัดจำหน่ายโดยวางไว้ในตู้เย็นของร้านซุปเปอร์มาเก็ตในห้างสรรพสินค้าที่อุณหภูมิประมาณ 20 องศาเซลเซียส

สลัดชนิดที่ 2 เป็นสลัดผักพร้อมบริโภคที่ผู้ขายจะใช้คีมคีบส่วนประกอบของสลัดแต่ละอย่างตามสั่งและบรรจุลงในถุงพลาสติก ส่วนน้ำสลัดนั้นแยกใส่ถุงต่างหาก ผู้ศึกษาได้ทำการเก็บตัวอย่างของสลัดในช่วงเย็น หลังจากผู้ผลิตเตรียมเสร็จแล้วประมาณ 5 ชั่วโมง โดยได้จัดผักสลัดใส่ภาชนะ มีการแยกชนิดของผักแต่ละประเภทและวางจำหน่ายในตู้กระจก ที่มีอุณหภูมิตู้ประมาณ 30 องศาเซลเซียส

หลังจากเก็บตัวอย่างของสลัดผักพร้อมบริโภคทั้ง 2 ชนิดมาแล้ว ได้นำตัวอย่างมาเก็บไว้ในกล่องโฟมที่มีความหนาประมาณ 1 นิ้ว ภายในบรรจุน้ำแข็ง แล้วจัดส่งไปยังห้องปฏิบัติการของภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อจัดเก็บในห้องเย็นที่อุณหภูมิประมาณ 7 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 24 – 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ต่อไป

3.4 วิธีการศึกษา มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.4.1 ใช้วิธีการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา โดยวิธี USFDA (2001)
(U.S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition (2001) Bacteriological Analytical Manual Online Chapter 10)

3.4.2 วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีการตามตาราง ICMSF (The International Commission of Microbiological Specifications for Foods) (Stannard, C. 1997) ตาราง E.C. (European Economic Community) (Stannard, C. 1997) ตาราง PHLS (Public Health Laboratory Service – London) (Robert, D. *et al.* 1995) และตารางกฎหมายของไทย (กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2536 อ้างในเรณู ปิ่นทอง 2543)

3.5 เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

3.5.1 เครื่องมือที่ใช้ในการสำรวจและเก็บตัวอย่างสลัดผักพร้อมบริโภคประกอบด้วย

1) กล่องโฟมขนาด 12 นิ้ว x 16 นิ้ว x 12 นิ้ว ภายในบรรจุน้ำแข็ง สำหรับเก็บรักษาตัวอย่างสลัดพร้อมบริโภคที่ซื้อจากแหล่งผลิตเพื่อทำการขนส่งไปตรวจวิเคราะห์ยังห้องปฏิบัติการ
2) เทอร์โมมิเตอร์
3) แบบฟอร์มบันทึกข้อมูลการเก็บตัวอย่างสลัดผักพร้อมบริโภค

3.5.2 เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ ประกอบด้วย

1) เครื่องชั่ง
2) ตู้บ่มเพาะเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส
3) Autoclave
4) ขวดแก้วขนาด 250, 100, 500 มิลลิลิตร
5) กระบอกตวง
6) คีมคีบผัก
7) ถุงพลาสติก
8) เครื่องตีปั่น (Stomacher)
9) ตะเกียงบุนเซน + ขาตั้ง
10) เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
11) ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)
12) แท่งแก้ว
13) จานเพาะเชื้อผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
14) ปิเปตผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.6 วิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ในสลัดผักพร้อมบริโภค

3.6.1 วิธีการตรวจหาจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count)

อุปกรณ์

1.) อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)

2.) Maximum Recovery Diluent(MRD) 450 มิลลิลิตร

3.) Maximum Recovery Diluent 90 มิลลิลิตร

4.) Maximum Recovery Diluent หลอดละ 9 มิลลิลิตร

การทำให้ตัวอย่างสลัดผักพร้อมบริโภคเจือจาง

1. เตรียมสลัดตัวอย่างของทั้ง 2 ชนิด

1.1 สลัดตัวอย่างของทั้งสองชนิด ทำการแยกชั่งกันตามน้ำหนักดังต่อไปนี้

1.1.1 ผักสลัด :

ผักกาดหอม จำนวน 25 กรัม

แครอท จำนวน 5 กรัม

แตงกวา จำนวน 10 กรัม

มะเขือเทศ จำนวน 10 กรัม

เพราะฉะนั้นน้ำหนักของผักสลัดรวมเป็น 50 กรัม

1.1.2 น้ำสลัดมายองเนส : จำนวน 10 กรัม

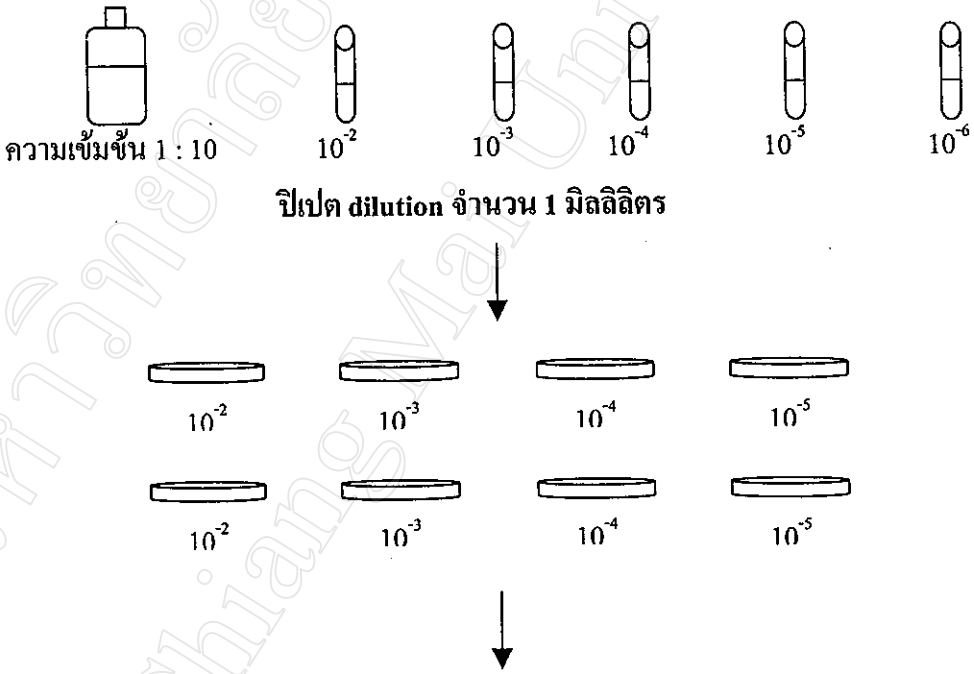
2. นำผักสลัดที่ชั่งมาแล้วจำนวน 50 กรัมมาตีปั่นให้อนุภาคมีขนาดเล็กลง เทรวมกับ Maximum Recovery Diluent (MRD) ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ในถุงพลาสติก นำน้ำสลัดที่ชั่งมาแล้วจำนวน 10 กรัม เทลงใน Maximum Recovery Diluent ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในถุงพลาสติก จากนั้นนำไปเข้าเครื่องตีปั่น นาน 1 นาที แล้วเทเก็บไว้ในขวดกลมฝาเกลียวขนาด 500 มิลลิลิตร ใส่ตัวอย่างผักสลัด และ 100 มิลลิลิตรใส่ตัวอย่างน้ำสลัด ซึ่งจะทำให้ได้สารละลายอาหารเจือจางระดับ 1 : 10 หรือ 10^{-1}

3. ถือปิเปต (blow – out pipette) ที่ฆ่าเชื้อแล้วในแนวดิ่ง จุ่มปลายปิเปตให้ต่ำกว่าผิวหน้าของสารละลายอาหารที่เตรียมได้ในข้างต้น ดูดตัวอย่างขึ้นลง 10 ครั้ง แล้วดูดสารละลายนี้ขึ้นมาจำนวน 1 มิลลิลิตร แตะปลายปิเปตกับคอขวด เพื่อกำจัดของเหลวที่ติดทางด้านนอกของปิเปต นำไปใส่ในหลอด MRD ที่เตรียมไว้จำนวน 9 มิลลิลิตร สำหรับเจือจางเชื้อ โดยแตะปลายปิเปตที่มีสารละลายเชื้อที่ข้างหลอดเหนือระดับสารละลายที่อยู่ในหลอด แล้วปล่อยให้สารละลายลงไปในหลอด คาปิเปตไว้ในตำแหน่งเดิม 3 วินาที จึงเป่ากำจัดสารละลายของเชื้อออกจากปิเปตให้หมด เก็บปิเปตที่ใช้แล้วนี้ใส่ในภาชนะสำหรับนำไปทำความสะอาด เขียนตัวเลขกำกับที่ข้างหลอดนี้เป็นความเข้มข้น 10^{-2}

4. นำปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดสารละลายของเชื้อที่เจือจางระดับที่ 10^{-2} ที่เตรียมได้ในข้างต้นจำนวน 1 มิลลิลิตร แล้วเป่าออก ทำการดูดเข้าแล้วเป่าออกเช่นนี้ 10 ครั้ง เพื่อผสมเชื้อและสารละลายให้เข้ากันดี (อาจใช้เครื่องหมุนหลอดอย่างแรงผสมให้เข้ากันดีก็ได้) ดูดสารละลายจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด MRD 9 มิลลิลิตร วิธีปล่อยสารละลายก็ทำเช่นเดียวกันกับที่ทำในข้อ 3 จะได้ตัวอย่างเชื้อที่เจือจาง 10^{-3} และทำเจือจางต่อไปจนได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม

5. นำปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตรที่ฆ่าเชื้อแล้ว ดูดสารละลายอาหารที่เจือจางที่ 10^{-2} ,10^{-3},10^{-4} และ 10^{-5} ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ทำตัวอย่างละ 2 จาน

ภาพที่ 3.1 แสดงการทำให้ตัวอย่างสลัดพร้อมบริโภคเจือจาง (dilution) และ การเท Pour Plate



เทอาหารเลี้ยงเชื้อ (NA) อุณหภูมิ 45 – 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 10-15 มิลลิลิตร ลงไปผสม เขย่าให้เข้ากัน เมื่อวุ้นแข็งตัวแล้วคว่ำจาน

6. นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

วิธีการคำนวณ colony forming unit (cfu) / gram or milliliter

$$N = \frac{C}{V(n_1 + 0.1n_2)d_1}$$

เมื่อ N = จำนวน cfu/g (ml)

V = ปริมาตรของ inoculum (สารละลายตัวอย่างที่ใช้ตรวจ)

n_1 = จำนวนจานเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นแรก

n_2 = จำนวนจานเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นที่ 2

d_1 = ระดับความเข้มข้นแรก

C = จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่นับได้จากจานเลี้ยงเชื้อ

3.6.2 วิธีการตรวจหาเชื้อราและยีสต์ (Yeast and Mould Count)

การทำให้ตัวอย่างสลัดพร้อมบริโภคเจือจาง ทำเช่นเดียวกันกับการหาเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น Potato Dextrose agar (PDA) ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัวแล้วจึงทำการ spread plate บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน สังเกตและนับจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนอยู่ระหว่าง 10-150 โคโลนี คำนวณเป็น cfu/g

การทำ spread plate

- เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ลงในจานเพาะเชื้อ ประมาณ 10 มิลลิลิตรทิ้งไว้ให้อาหารวุ้นแข็งตัว
- ปิเปตสารละลายอาหารจำนวน 0.1 มล. หยดลงตรงกลางของผิวหน้าที่แห้งของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วใช้แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ระวังอย่าให้โดนขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจะทำ spread plate สารละลายของในส่วนผัก น้ำสลัด ที่ความเข้มข้น 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} ความเข้มข้นละ 2 จาน
- วางจานเพาะเชื้อไว้นานประมาณ 15 นาที เพื่อให้สารละลายอาหารซึมเข้าไปในวุ้น แล้วจึงคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของเชื้อจากจานที่มีจำนวน 10-150 โคโลนี และคำนวณเป็น cfu/g

3.6.3 วิธีการตรวจหาเชื้อ Coliforms และ *Escherichia coli* ด้วยวิธี MPN (Most Probable Number)

อุปกรณ์

1. Lauryl Sulphate Broth (LSB) : single strength
2. Maximum Recovery Diluent จำนวน 450 มิลลิลิตร
3. Maximum Recovery Diluent จำนวน 90 มิลลิลิตร
4. Maximum Recovery Diluent หลอดละ 9 มิลลิลิตร
5. Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLBB)
6. Tryptone water และ LST

ขั้นตอนการตรวจ

การเตรียมสลัดพร้อมบริโภค ทั้ง 2 ชนิด

1. ทำการเจือจางตัวอย่างที่ 10^{-1} , 10^{-2} ,10^{-3} และ 10^{-4} เช่นเดียวกับข้อ 3.6.1

2 ทำการเพาะเชื้อ ดังนี้

ชุดที่ 1 ดูดอาหารตัวอย่างเจือจาง 10^{-1} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LST จำนวน 3 หลอด

ชุดที่ 2 ดูดอาหารตัวอย่างเจือจาง 10^{-2} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LST จำนวน 3 หลอด

ชุดที่ 3 ดูดอาหารตัวอย่างเจือจาง 10^{-3} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LST จำนวน 3 หลอด

การบ่มหลอดอาหารทั้งหมดในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วสังเกตหลอดที่เกิดแก๊สและบันทึกจำนวนหลอดที่เกิดแก๊ส

การยืนยันผล Coliforms (confirmation)

ใช้ห่วงถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ LST ที่เกิดแก๊สแต่ละหลอดลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLBB จำนวน 1 ห่วง บ่มหลอดอาหารในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง สังเกตหลอดที่เกิดแก๊สและบันทึกจำนวนหลอดที่เกิดแก๊ส อ่านค่า MPN จากตาราง รายงานการตรวจพบเชื้อ Coliforms เป็น MPN/g

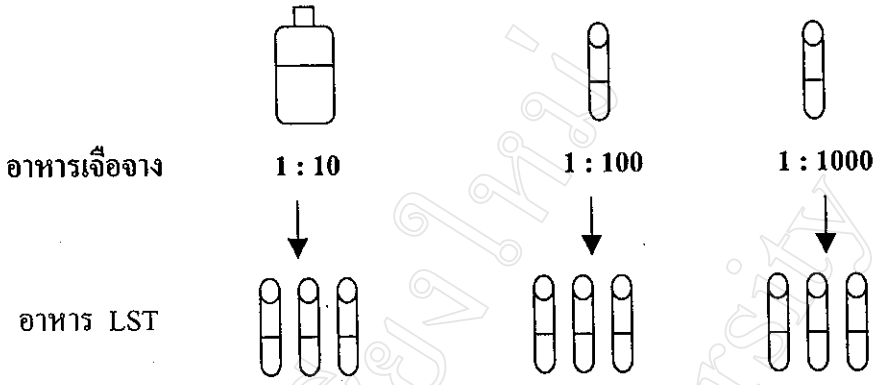
การยืนยันผล Faecal Coliform

ใช้ห่วง ถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLBB ที่เกิดแก๊สแต่ละหลอด ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLBB จำนวน 1 ห่วงอีกครั้งหนึ่ง บ่มหลอดอาหารที่อุณหภูมิ 44± 0.5 องศาเซลเซียส ใน water bath นาน 48 ชั่วโมง สังเกตหลอดที่เกิดแก๊สและบันทึกจำนวนหลอดที่เกิดแก๊สอ่านค่า MPN จากตารางรายงานการตรวจพบเชื้อ faecal coliform เป็น MPN /g

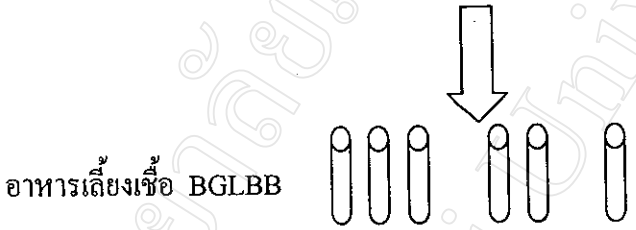
การยืนยันผล *Escherichia coli*

ใช้ห่วง ถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ BGLBB ที่เกิดแก๊สแต่ละหลอดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone water จำนวน 1 ห่วง บ่มหลอดอาหารที่อุณหภูมิ 44± 0.5 องศาเซลเซียส ใน water bath นาน 48 ชั่วโมง นำไปทดสอบการเกิด indole บันทึกจำนวนหลอดที่เกิดผลบวก อ่านค่า MPN จากตาราง รายงานการตรวจพบเชื้อ *Escherichia coli* เป็น MPN /g

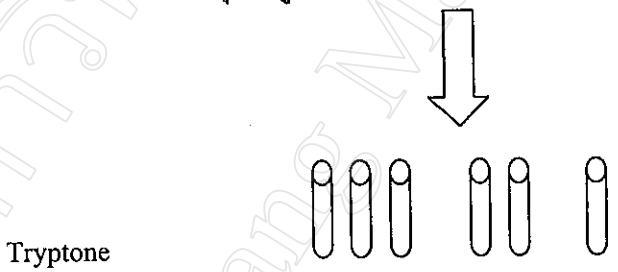
ภาพที่ 3.2 แสดงการตรวจหาเชื้อ Coliforms และเชื้อ *E.coli* ในอาหาร



บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง สังเกตหลอดที่เกิดแก๊ส



บ่มที่อุณหภูมิ 44± 0.5 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง



บ่มที่อุณหภูมิ 44± 0.5 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ใน water bath ทดสอบ indole

วิธีการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในสลัดผักพร้อมบริโภค

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

1. Enrichment Broth (buffer peptone water)
   - น้ำสลัดใช้ 225 ml
   - ผักสลัดใช้ 425 ml
2. Selective Enrichment Media
   - Tetrathionate Brilliant Green Broth (TTB) 100 ml
   - Selenite Cystine Broth (SCB) 100 ml
3. Selective Plating Media

- Brilliant – Green Phenol - red Lactose Sucrose Agar (BPLS) 2 จาน
- XLD agar 2 จาน

4. SIM-Medium
5. TSIA
6. Urea Agar
7. Lysine Decarboxylase broth
8. ในส่วนของผักสลัดจะใช้ Enrichment Broth (buffer peptone water) 450 ml

วิธีการทดลอง

1. ชั่งตัวอย่างน้ำสลัด 25 กรัมใส่ใน Enrichment Broth (buffer peptone water) 225 มิลลิลิตร และชั่งตัวอย่างผักสลัด 50 กรัมใส่ใน Enrichment Broth (buffer peptone water) 450 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องปั่นนาน 1 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
2. ปิเปต Enrichment Broth ที่ได้จากข้อ 1 ลงใน Seletive Enrichment Media
   ก. ถ่ายเชื้อจากข้อ 1 จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tetrathionate Broth 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้ออุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
   ข. ถ่ายเชื้อจากข้อ 1 จำนวน 10 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Selenite Cystine Broth 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง
3. ทำการแยกเชื้อ (Isolation)
   ก. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Tetrathionate Broth ลงในผิวหน้าแห้งของ Selective agar คือ Bismuth sulfite, XLD-agar, Brilliant – Green Phenol-red Lactose Sucrose Agar (BPLS-agar)
   ข. ถ่ายเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Selenite Cystine Broth เช่นเดียวกับข้อ ก ข้างบนนี้ลงในผิวหน้าแห้งของ Selective agar คือ XLD-agar, Brilliant – Green Phenol-red Lactose Sucrose Agar (BPLS-agar)
   ค. บ่มจาน Selective agar ทั้งหมดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วทำการสังเกตลักษณะสีของโคโลนี ดังนี้

   - **XLD-agar** :

   ลักษณะ typical colony ของ *salmonella* คือ โคโลนีสีชมพูจะมีหรือไม่มีสีดำตรงกลางของโคโลนีก็ได้

   - **Brilliant-Green Phenol-red Lactose Sucrose Agar** (BPLS-agar) :

ลักษณะ typical colony ของ *Salmonella* คือ โคโลนีสีชมพู และพื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยรอบโคโลนีเป็นสีแดง

4. ทำการยืนยันผล (confirmation) โดยการทดสอบทางชีวเคมีดังนี้

- Triple Sugar Iron agar (TSI)

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ ถ่ายเชื้อจากตรงกลางของ typical colony ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI โดยการเกลี่ยเชื้อ (streak) และแทง (stab) ลงในอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยเชื้อ *Salmonella* จะให้ผลดังนี้

ผิวหน้าเอียงของอาหารเป็นสีแดงเนื่องจากเป็นด่าง (alkaline red slant)

บริเวณที่เป็นรอยแทงเป็นสีเหลืองเนื่องจากเป็นกรด (acid yellow butt) อาจมีหรือไม่มีสีดำของ H_2S

ควรตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยการย้อมสีกรัมแล้วส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบเซลล์เป็นรูปแท่ง ติดสีกรัมลบ ไม่มีสปอร์ ถ้าเชื้อไม่บริสุทธิ์ให้ทำการขีดเชื้อใหม่ (restreak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey และ XLD agar บ่มเชื้อที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

- Urea agar

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร TSI ที่ให้ผลเป็น positive ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Urea agar โดยการเกลี่ยเชื้อ (streak) ลงบนผิวหน้าเอียงของอาหาร บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง ควรทำหลอดควบคุมโดยถ่ายเชื้อ *Salmonella* แทนเชื้อจากอาหารตัวอย่างด้วยเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบและตรวจสอบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีการปนเปื้อนก่อนที่จะนำมาทดสอบ *Salmonella* จะให้ผลคือ อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง (urea negative)

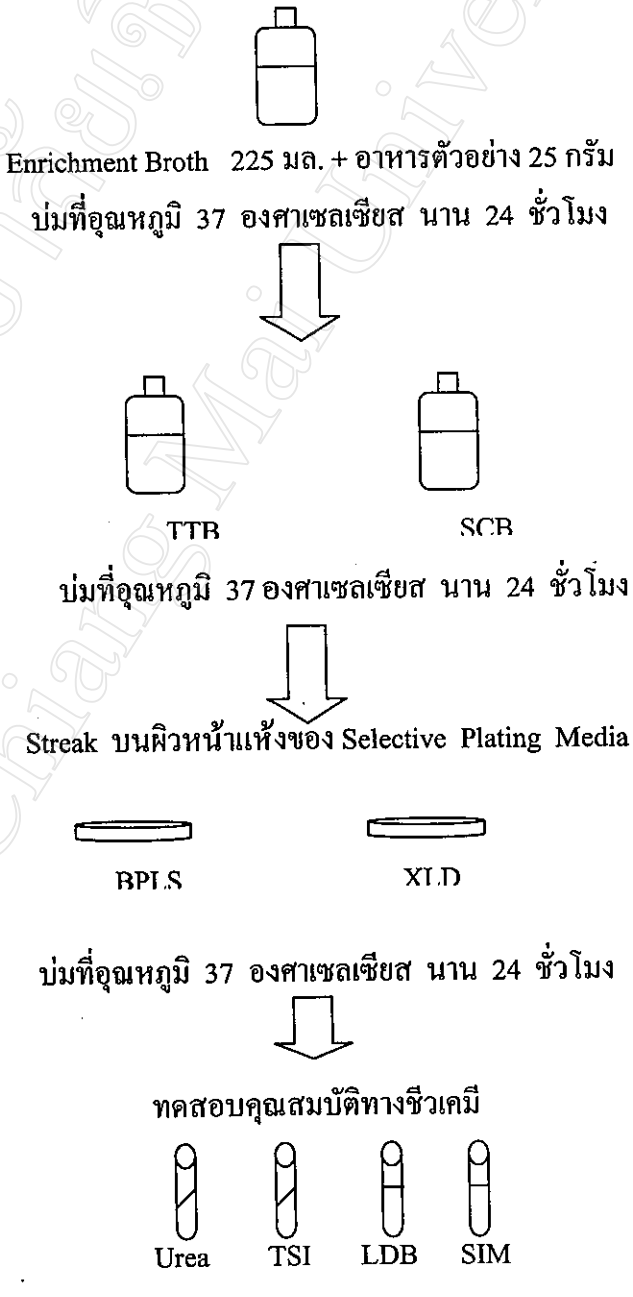
- Lysine decarboxylase broth

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์จากหลอดอาหาร TSI ที่ให้ผลเป็น positive ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Lysine decarboxylase broth ปริมาณเพียงเล็กน้อย บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ควรทำหลอดควบคุมด้วยเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบและตรวจสอบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีการปนเปื้อนก่อนที่จะนำมาทดสอบ ตรวจสอบผลหลังจากบ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง เชื้อ *Salmonella* จะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นด่าง (alkaline) อาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นสีม่วงทั้งหลอด ส่วน negative test อาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

- SIM – medium

ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์จากหลอดอาหาร TSI ที่ให้ผลเป็น positive ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SIM – medium โดยการแทงลงบนผิวหน้าของอาหาร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง ควรทำหลอดควบคุมด้วยเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบและตรวจสอบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีการปนเปื้อนก่อนที่จะนำมาทดสอบเชื้อ *Salmonella* จะให้ผล indole ใน SIM - medium negative (หยดสารละลาย indole แล้วไม่เปลี่ยนสี)

ภาพที่ 3.3 แสดงการตรวจหาเชื้อ *Salmonella* ในอาหาร



3.6.4 วิธีการตรวจหาเชื้อ *Staphylococcus aureus*

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้

1. Trypticase soy broth Nacl 10 %
2. Sodium pyruvate 1 %
3. Baird Parker agar (BPA)
4. Brain Heart Infusion Broth (BHI)

วิธีการทดลอง

1. ทำการเจือจางผักสลัด และน้ำสลัด ให้ได้ระดับ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} (ตามวิธีในข้อย่อยที่ 1 ของข้อ 3.6.1)

2. นำห่วงถ่ายเชื้อ ถ่ายอาหารที่ผ่านการเจือจางในแต่ระดับ โดยใช้วิธีการตรวจสอบแบบ MPN - Method : 3 tube/dilution (ทั้งผักสลัด, น้ำสลัด) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth ที่มีเกลือ (Nacl) เข้มข้น 10 % และ Sodium pyruvate 1 % บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลานาน 48 ชั่วโมง

3. ใช้ห่วงถ่ายเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ถ่ายเชื้อจำนวน 1 ห่วง จากหลอด อาหาร TSB ที่มีเชื้อเจริญ (อาหารขุ่น) ให้เขย่าหลอดก่อนที่จะถ่ายเชื้อ Streak ลงบนผิวหน้าแห้งของอาหาร Baird Parker agar (BPA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลานานนาน 48 ชั่วโมง

4. ดูผลของเชื้อที่ขึ้นบน BPA โดยที่ลักษณะของเชื้อจะเป็นโคโลนีสีดำมีวงใสล้อมรอบ แล้วเลือกโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวมาทำการทดสอบ Coagulase Test (เชื้อต้องไม่เกิน 18 ชั่วโมง) โดยทำการถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่คาดว่าเป็น *Staphylococcus aureus* เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI จำนวน 2 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก เขย่าให้เข้ากันดีและเลี้ยงเชื้อในหลอดอาหาร trypticase soy broth NaCl 10% ด้วยเพื่อเก็บไว้ทดสอบซ้ำในกรณีที่ผลการทดสอบ Coagulase ไม่ชัดเจน

5. บ่มหลอดอาหารทั้งหมดในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 16-18 ชั่วโมง

6. ถ่ายเชื้อจากหลอดในข้อ 5 จำนวน 0.2 มิลลิลิตรลงในหลอดแก้วเปล่าที่ฆ่าเชื้อแล้วเติม Coagulase plasma with EDTA จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดนี้ เขย่าให้เข้ากันดี บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน water bath สังเกตการแข็งตัวของพลาสมา ระหว่างการบ่มเชื้อนาน 6 ชั่วโมง

- ถ้าเกิดการแข็งตัวของพลาสมาในระดับ 3+ หรือ 4+ ตัดสินได้ว่า Coagulase Positive

- ถ้าเกิดการแข็งตัวของพลาสมาในระดับ 1+ และ 2+ ควรยืนยันผลโดยการเลี้ยงเชื้อใน BHI อีกครั้ง และใช้เวลาในการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มากกว่า 18 ชั่วโมง แต่ไม่ควรเกิน 48 ชั่วโมง แล้วทดสอบ Coagulase ใหม่อีกครั้ง และต้องมั่นใจว่าเชื้อที่นำมาทดสอบนั้นบริสุทธิ์

7. ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีอื่น ๆ เพิ่มเติม โดยการย้อมสีกรัม โดยจะเป็นกรัมบวก รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 ไมโครเมตร จับกันเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น (เรณู ปิ่นทอง , 2543)

3.7 สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการศึกษาและรวบรวมข้อมูล

การศึกษาครั้งนี้ได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างสลัดผักพร้อมบริโภคจากร้านอาหารในมหาวิทยาลัยเชียงใหม่และซุปเปอร์มาเก็ตในห้างสรรพสินค้าจำนวน 5 แห่ง ที่อยู่ในเขตอำเภอเมืองจังหวัดเชียงใหม่ โดยได้มีการตรวจวิเคราะห์ ปริมาณของจุลินทรีย์ในสลัดผักพร้อมบริโภคที่ห้องปฏิบัติการของภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ แล้วปรึกษาการวิเคราะห์และสรุปข้อมูลที่สาขาวิชาร่วมโภชนศาสตร์ศึกษา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่