บทที่3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง
อุปกรณ์และสารเคมี

1.วัตถุดิบ

- ซาลโมเนลลา เวลเทปเรเดน (*Salmonella* Weltevreden DMST 17375, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, ประเทศไทย)

2.อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

- ปิเปตแบบ Autopipette ขนาด 1,000 ไมโครลิตร (Biohit Proline, Finland)
- ปิเปตแบบ Autopipette ขนาด 50 ไมโครลิตร (Biohit Proline, Finland)
- Tip สีฟ้า ขนาด 1-1,000 ไมโครลิตร (Axygen, USA)
- Tip สีเหลือง ขนาด 1- 200 ไมโครลิตร (Axygen, USA)
- จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก (Petri dish (90 มิลลิเมตร) Sterile) (Millionant™, France)
- หม้อนึ่งความดัน (Gallenkamp, England)
- loop เขี่ยเชื้อ
- ปากกา permanent
- ไม้บรรทัด
- หลอดทดลอง 16x150 มิลลิเมตร (Pyrex®, USA)
- ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส (Termaks)
- เครื่องนับจำนวนโคโลนี
- ตู้เขี่ยเชื้อ
- ตะเกียงบุนเสน
- แอลกอฮอล์ 70%
- ถุงมือยาง (Sempermed®, Thailand)
- เครื่องเขย่า (Vortex) (Heidolph, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 อุปกรณ์สำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

- หม้อนึ่งความดัน (Gallenkamp, England)
- บีกเกอร์สเตนเลสขนาด 2 ลิตร
- บีกเกอร์แก้วขนาด 100 มิลลิลิตร (Kimax, USA)
- ขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 500 มิลลิลิตร (Schott Duran, Germany)
- ช้อนตักสาร
- แท่งแก้วคนสาร
- ปิเปตแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร (HBG, Germany)
- ปิเปตแบบMeasuring pipettes (Universal dispenser) (Fortuna®Optifix®, Germany)
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany)
- เครื่องวัด pH Meter ทศนิยม 2 ตำแหน่ง(WTW pH357, Germany)
- ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 55 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส (Termaks)
- Water bath (Memmert, Germany)
- ไมโครเวฟ

3.สารเคมี

- น้ำกลั่น
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 N (Sodium Hydroxide) (Merck, Germany)
- กรดไฮโดรคลอริก 2 N (Sodium chloride) (J.T.Baker, USA)
- ผงวุ้น (โอ.วี.เคมิคอล, ประเทศไทย)
- Brain Heart Infusion Broth (BHI Broth) (Oxide, England)
- Bacto peptone (BD, France)
- โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride) (Merck, Germany)
- Sodium DL-lactate (Sigma, USA)
- Maximum recovery diluent (MRD)
- Xylose lysine deoxycholate agar (XLD) (Merck, Germany)
- Brilliant green Phenol red Lactose Sucrose agar (BPLS) (Merck, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- Triple sugar /iron agar (TSI agar) (Merck, Germany)
- Urea agar (Christensen) (Difco, USA)
- Motile Indole L-Lysine decarboxylation (MIL) (Difco, USA)
- Voges-Proskauer(MR-VP) (Merck, Germany)

4.เครื่องประมวลผลข้อมูล

- เครื่องคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล
- โปรแกรมสำเร็จรูป Microsoft Excel 2000 (Microsoft corp., USA)
- โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 11 (SPSS Inc., USA)
- โปรแกรมสำเร็จรูป LEKSAWASDI RSS MINIMISATION

วิธีการทดลอง

3.1 การควบคุมคุณภาพของสิ่งที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 การควบคุมคุณภาพของเชื้อ *Salmonella* โดยการศึกษาลักษณะทางกายภาพและชีวเคมีของเชื้อ

(1)นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อ *Salmonella* จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ และใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแทงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ นำห่วงเขี่ยเชื้อนั้นมา streak ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

(2) ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยว 1 โคโลนี แล้วนำไปขีด (streak) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar อีกจาน นำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกัน เมื่อได้โคโลนีเดี่ยวจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อครั้งที่ 2 ก็นำไปขีดในจานอาหารเลี้ยงเชื้ออีกจานให้ได้โคโลนีเดี่ยวเช่นเดียวกัน

(3) ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อถ่ายโคโลนีเดี่ยวจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI บนผิวหน้าวุ้นเอียงในหลอดแก้ว (slant) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

(4) ทำการทดสอบเชื้อจากผิวหน้าวุ้นเอียงของ BHI agar (slant) โดยนำเชื้อไปทดสอบทางชีวเคมี (Biochem Test) โดยประยุกต์ตามวิธีของ ISO 6579 (2002) ดังนี้

ก) ทำการขีดลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD และ BPLS โดยทดสอบ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

ข) ในอาหาร XLD เลือกโคโลนีสีดำมีวงใสล้อมรอบ และในอาหาร BPLS เลือกโคโลนีสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ครีมบนพื้นอาหารเลี้ยงเชื้อสีแดง นำมาเกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงของ BHI agar จำนวน30 หลอด โดยที่จากอาหารเลี้ยงเชื้อ XLD เป็นผิวหน้าวุ้นเอียงที่1 และจากอาหารเลี้ยงเชื้อ BPLS เป็นผิวหน้าวุ้นเอียงที่ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

ค) ผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงจากข้อ ข) นำเชื้อในวุ้นผิวหน้าเอียงไปทำการเขี่ยเชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี BHI agar พร้อมกันนั้นทำการทดสอบทางชีวเคมี

- TSI Test แตะเชื้อจากผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงที่ 1 ด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ (needle) แทงเข็มตรงศูนย์กลางผิวหน้าอาหารเอียงของ TSI agar แนวตั้งฉาก โดยเว้นระยะห่างจากก้นหลอด ¼ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI นำห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อจากผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงหลอดเดิม ขีดในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSI บนผิวหน้าอาหารวุ้นเอียง ทำเช่นเดิมในอาหาร TSI agar หลอดใหม่ 2 หลอด แตะเชื้อจากผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงที่ 2 ด้วยเข็มเขี่ยเชื้อ (needle) ทำเช่นเดียวกับเชื้อจากผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงที่ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วทำการอ่านผล

- Urea Test แตะเชื้อจากผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงที่ 1 ด้วยห่วงเขี่ยเชื้อ ขีดบนผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงของ Urea agar ทำเช่นเดิมในอาหาร Urea agar หลอดใหม่ 2 หลอด แตะเชื้อจากผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงที่ 2 ด้วยห่วงเขี่ยเชื้อ ทำเช่นเดียวกับเชื้อจากผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงที่ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วทำการอ่านผล

- MIL Test นำห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อจากผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงที่ 1 แทงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MIL semi solid โดยเว้นระยะห่างจากก้นหลอด ¼ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ MIL semi solid ทำเช่นเดิมในอาหาร MIL semi solid หลอดใหม่ 2 หลอด แตะเชื้อจากผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงที่ 2 ด้วยห่วงเขี่ยเชื้อ ทำเช่นเดียวกับเชื้อจากผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงที่ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วทำการอ่านผล

- MR-VP Test นำห่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อจากผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงที่ 1 จุ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ MR-VP liquid ทำเช่นเดิมในอาหาร MR-VP liquid หลอดใหม่ 2 หลอด แตะเชื้อจากผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงที่ 2 ด้วยห่วงเขี่ยเชื้อ ทำเช่นเดียวกับเชื้อจากผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงที่ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วทำการอ่านผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(5) จากผลการทดสอบทางชีวเคมี ถ้าพบว่าผลที่ได้เป็นคุณสมบัติของเชื้อ *Salmonella* spp. แล้วจึงนำเชื้อที่ทำการเขี่ยลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agarในข้อ ค) มาทำการต่อเชื้อลงในอาหารเลี้ยง BHI บนผิวหน้าวุ้นเอียงในหลอดแก้ว แล้วจึงนำเชื้อจากโคโลนีเดียวกันมาทำการย้อมสีกรัม จากผล

การย้อมสีกรัม ถ้าแสดงสัณฐานของเชื้อ *Salmonella* spp. จึงทำ stock culture โดยทุก stock culture ได้ผ่านการทดสอบทางชีวเคมีตามข้อ (4) ทุกหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เก็บในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การย้อมสีกรัม(Gram's stain)

- ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะน้ำสะอาดลงบนแผ่นสไลด์ จำนวน 1 ห่วง
- ใช้ห่วงถ่ายเชื้อแตะเชื้อจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ (5) โดยแตะโคโลนีที่เหลือจากการถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยง BHI บนผิวหน้าวุ้นเอียงในหลอดแก้วตามข้อ (5) ลงบนหยดน้ำบนสไลด์ เกลี่ย (smear) ให้กระจาย
- ปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้วนำไปผ่านเปลวไฟ (heat fixed) ประมาณ 1 วินาที
- หยดสารละลาย crystal violet ลงไปให้ท่วมรอยเกลี่ยทิ้งไว้นาน 30 วินาที
- หยดสารละลาย gram's iodine ลงไปให้ท่วมรอยเกลี่ยที่ยังมีสารละลาย crystal violet อยู่ทิ้งไว้นาน 30 วินาที เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วยน้ำเบาๆ
- ล้างด้วย 95% ethanol อย่างรวดเร็ว จนไม่มีสีน้ำเงินของสารละลาย crystal violet ออกมา แต่ต้องไม่เกิน 20 วินาที ล้างด้วยน้ำเบาๆ
- หยดสารละลาย safranin ลงไปให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้นาน 5 วินาที เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วยน้ำเบาๆ ซับน้ำออกให้แห้งดี นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกลักษณะการติดสีกรัมและรูปร่างลักษณะของเซลล์

<u>**หมายเหตุ**</u>: ทุกขั้นตอนของการถ่ายเชื้อต้องใช้วิธีการไร้เชื้อ (aseptic technique)

3.1.2 การตรวจสอบค่า pH ของโซเดียมแลกเทต (ทำครั้งแรกก่อนเริ่มการทดลองทั้งหมด)

(1) ใช้ปิเปตขนาด 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายของโซเดียมแลกเทต จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงในขวดทดลองจำนวน 3 ขวด (ขวด McCartney)

(2) วัดค่า pH โดยเครื่องวัด pH Meter อ่านค่าโดย 1 ขวดอ่านค่า 1 ครั้ง แล้วบันทึกค่าเป็นค่าก่อนการฆ่าเชื้อ

(3) ทำการฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เวลา 15 นาที

(4) วัดค่า pH โดยเครื่องวัด pH Meter อ่านค่า และบันทึกค่าเป็นค่าหลังการฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเปรียบเทียบค่าก่อนและหลังฆ่าเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.3 การเตรียมและการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth, BHI agar และ MRD

3.1.3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth, BHI agar และ MRD

(1) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth

ก) คำนวณปริมาตรที่ใช้ในขวด McCartney จำนวน 5 ขวดต่อการทดลอง 1 ครั้งโดยบรรจุปริมาตร 9 มิลลิลิตรต่อขวด ได้ 5 ขวด x 9 มิลลิลิตรเท่ากับ 45 มิลลิลิตร ประมาณ 50 มิลลิลิตร จากอัตราส่วนคือ BHI 37 กรัมต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร คำนวณปริมาณ BHI ดังนี้

$$\frac{37 \times 50}{1{,}000} = 1.85 \text{ กรัม}$$

ข) นำช้อนตักสารตัก BHI ชั่งบนเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งในบีกเกอร์แก้ว จนหนัก 1.85 กรัม เทน้ำกลั่นลงในกระบอกตวงจนได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ค) เทน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์แก้วที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ผง ใช้แท่งแก้วคนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำปิเปตแก้วขนาด 10 มิลลิลิตรดูดสารละลายจำนวน 9 มิลลิลิตรใส่ลงในขวด McCartney จำนวน 5 ขวด

ง) ทำการฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เวลา 15 นาที

(2) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ในหน่วยทดลอง

ก) คำนวณปริมาตรที่ใช้ในขวด McCartney จำนวน 50 ขวดต่อ 1 หน่วยการทดลอง (Treatment) โดยบรรจุปริมาตร 9 มิลลิลิตรต่อขวด ได้ 50 ขวด x 9 มิลลิลิตรเท่ากับ 450 มิลลิลิตร ประมาณ 500 มิลลิลิตร จากอัตราส่วนคือ BHI 37 กรัมต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร คำนวณปริมาณ BHI ดังนี้

$$\frac{37 \times 500}{1{,}000} = 18.5 \text{ กรัม}$$

ข) คำนวณปริมาณปัจจัย

โซเดียมคลอไรด์ 3 ระดับคือ 0%, 2% และ 4 % ตามลำดับ

-โซเดียมคลอไรด์ 2 % คือ (2 x 500)/100 = 10 กรัม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

-โซเดียมคลอไรด์ 4 % คือ (4 x 500)/100 = 20 กรัม

โซเดียมแลกเทต 3 ระดับคือ 0%, 1.2% และ 2.4 % ตามลำดับ

-โซเดียมแลกเทต 1.2 % เตรียมจากโซเดียมแลกเทต 60% w/w ต้องการความเข้มข้น 1.2 % จากปริมาตร 500 มิลลิลิตร เนื้อสารมีโซเดียมแลกเทตอยู่ 60 % ดังนั้น จะต้องชั่งมา (1.2 x 500)/60 = 10 กรัม

-โซเดียมแลกเทต 2.4 % เตรียมจากโซเดียมแลกเทต 60% w/w ต้องการความเข้มข้น 2.4 % จากปริมาตร 500 มิลลิลิตร เนื้อสารมีโซเดียมแลกเทตอยู่ 60 % ดังนั้น จะต้องชั่งมา (2.4 x 500)/60 = 20 กรัม

ค) นำช้อนตักสารตัก BHI ชั่งบนเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งในบีกเกอร์แก้ว จนหนัก 14.8 กรัม และชั่งโซเดียมคลอไรด์ ณ ระดับที่ต้องการ ลงในบีกเกอร์แก้วที่มี BHI ผง ดูดสารละลายโซเดียมแลกเทตลงในบีกเกอร์แก้วที่มี BHI และโซเดียมคลอไรด์อยู่ จนได้น้ำหนักโซเดียมแลกเทตที่ต้องการ เทน้ำกลั่นลงในกระบอกตวงจนได้ปริมาตร 400 มิลลิลิตร

ง) เทน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์แก้วจากข้อ ค) ใช้แท่งแก้วคนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำปิเปตแก้วขนาด 10 มิลลิลิตรดูดสารละลายผสมจำนวน 9 มิลลิลิตรใส่ลงในขวด McCartney จำนวน 50 ขวด

จ) ทำการฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เวลา 15 นาที

(3) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar

ก) คำนวณปริมาตรที่ใส่ในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 500 มิลลิลิตร โดยบรรจุปริมาตร 400 มิลลิลิตรต่อขวด จากอัตราส่วนคือ BHI 37 กรัมต่อน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร คำนวณปริมาณ BHI ดังนี้

$$\frac{37 \times 400}{1,000} = 14.8 \text{ กรัม}$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ข) คำนวณปริมาณ agar โดยมีความเข้มข้น 2% คำนวณดังนี้

$$\frac{2 \times 400}{100} = 8 \text{ กรัม}$$

ค) นำช้อนตักสารตัก BHI ชั่งบนเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งในบีกเกอร์แก้ว จนหนัก 14.8 กรัม ชั่ง agar หนัก 8 กรัมในบีกเกอร์แก้วที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI เทน้ำกลั่นลงในกระบอกตวงได้ปริมาตร 400 มิลลิลิตร

ง) เทน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์แก้วที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI และ agar ใช้แท่งแก้วคนผสม อุ่นสารละลายผสมในไมโครเวฟจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

จ) ทำการฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เวลา 15 นาที

ฉ) นำอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใส่ water bath อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

ช) ใช้แอลกอฮอล์ 70% เช็ดภายในตู้เขี่ยเชื้อ เตรียมจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกที่ปราศจากเชื้อใส่ในตู้เขี่ยเชื้อ จุดตะเกียงบุนเสนในตู้เขี่ยเชื้อ นำอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ออกจาก water bath เช็ดน้ำรอบขวดด้วยสำลี พ่นแอลกอฮอล์ 70% รอบขวด ตั้งในตู้เขี่ยเชื้อจนแอลกอฮอล์ระเหยหมด

ฌ) เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเลี้ยงเชื้อพลาสติก ด้วยวิธีไร้เชื้อ (aseptic technique) รอจนผิวหน้าอาหารแข็งตัว จึงกลับจานอาหารเลี้ยงเชื้อเก็บในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ญ) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ ฌ) ออกจากห้องเย็น เช็ดทำความสะอาดภายในตู้บ่มอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสด้วยสำลีชุบแอลกอฮอล์ 70% ทำการตากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar โดยเปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 25-30 นาที ขณะทำการเปิดคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง โดยผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อไม่หงายขึ้น คว่ำส่วนฝาปิดด้านบนลงบนพื้นตู้บ่มที่ทำความสะอาดแล้ว นำจานอาหารส่วนที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อวางทับฝาจนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

ฎ) นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ ญ) ออกจากตู้บ่มอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสโดยยกจานอาหารส่วนที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นและห้ามหงายผิวหน้าอาหาร นำฝาของจานอาหารปิดจานอาหารในลักษณะคว่ำจานอาหาร ใส่ถุงพลาสติกในลักษณะคว่ำจานอาหาร ฉายรังสี UV ที่ตู้เขี่ยเชื้อนาน 15-20 นาที นำไปใช้ในการทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(4) การเตรียม MRD

ก) คำนวณปริมาตรที่ใช้ในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร จำนวน 350 หลอด ต่อ 2 หน่วยการทดลอง (Treatment) โดยบรรจุปริมาตร 9 มิลลิลิตรต่อหลอด ได้ 350 หลอด x 9 มิลลิลิตรเท่ากับ 3,150 มิลลิลิตร ประมาณ 3,200 มิลลิลิตร

ข) คำนวณปริมาณเปปโตน (Peptone) โดยมีความเข้มข้น 0.1% คำนวณดังนี้

$$\frac{0.1 \times 3{,}200}{100} = 3.2 \text{ กรัม}$$

ค) คำนวณปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โดยมีความเข้มข้น 0.85% คำนวณดังนี้

$$\frac{0.85 \times 3{,}200}{100} = 27.2 \text{ กรัม}$$

ง) นำช้อนตักสารตักเปปโตนและโซเดียมคลอไรด์ ชั่งบนเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งในบีกเกอร์แก้ว จนหนัก 3.2 และ 27.2 กรัมตามลำดับ เทน้ำกลั่นลงในกระบอกตวงจนได้ปริมาตร 3,200 มิลลิลิตร

จ) เทน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์แก้วที่มีเปปโตนและโซเดียมคลอไรด์ ใช้แท่งแก้วคนผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำปิเปตแบบ Measuring pipettes ปรับปริมาตรและดูดสารละลายจำนวน 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร จำนวน 350 หลอด

ฉ) ทำการฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เวลา 15 นาที

3.1.3.2 การตรวจสอบความปนเปื้อนของอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI Broth และ MRD (Maximum Recovery Diluent)

(1) ก่อนดำเนินการทดลองทุกครั้ง (1 วันก่อนการทำ lab) ทำการตรวจ BHI broth, BHI broth ในหน่วยทดลอง และ MRD ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เวลา 15 นาที โดยสุ่มทุกชุดที่ทำการฆ่าเชื้อพร้อมกันชุดละ 3 หลอดของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด โดยการทำ pour plate ดังนี้

ก) ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้วดูดอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth หรือ BHI broth ในหน่วยทดลอง หรือ MRD จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ทำซ้ำเช่นนี้จำนวน 2 จานในแต่ละขวด

ข) เทอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar จากข้อ 3.1.3.1 (3) ซึ่งได้ฆ่าเชื้อและหลอมเหลวแล้ว (อุณหภูมิไม่เกิน 45 องศาเซลเซียส) จำนวน 10-15 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth หรือ BHI broth ในหน่วยทดลอง หรือ MRDอยู่ ผสมสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth หรือ BHI broth ในหน่วยทดลอง หรือ MRD และอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ให้กระจายเข้ากันดีโดย ก) เขย่าไปข้างบนและข้างล่าง 5 ครั้ง ข) เขย่าไปทางซ้ายและขวา 5 ครั้ง ค) เขย่าให้หมุนตามเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง และ ง) เขย่าหมุนทวนเข็มนาฬิกา 5 ครั้ง ในขณะที่เขย่าควรระมัดระวังไม่ให้อาหารเลอะติดฝาจานเลี้ยงเชื้อ

(2) ปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว แล้วกลับจานเลี้ยงเชื้อให้คว่ำลง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

(3) อ่านผลการทดลอง

3.2.การทดสอบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* ใน BHI เบื้องต้นก่อนการทดลองจริง

3.2.1 การทดลองเพื่อศึกษาหาปริมาณของเชื้อ *Salmonella* spp. ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BHI broth และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(1) ถ่ายเชื้อ *Salmonella* Weltevreden จาก stock culture ที่เตรียมไว้ ตามข้อ 3.1.1(5) ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการ ขีดเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกันนี้ เป็นจำนวน 3 ครั้ง ด้วยวิธีการเดียวกัน

(2) เขี่ยเชื้อ *Salmonella* Weltevreden 1 โคโลนี จากจานอาหารที่ผ่านการ ขีดเชื้อเป็นครั้งที่ 3 ลงในขวดอาหาร BHI broth ที่มีปริมาตร 9 มิลลิลิตร จำนวน 2 ขวด

(3) ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจากร่องรอยของโคโลนีเดิมในข้อ (2) ไปทำการย้อมสีกรัม เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อหากเชื้อไม่บริสุทธิ์ จะต้องยกเลิกการเลี้ยงเชื้อใน BHI broth และต้องทำการถ่ายเชื้อจาก stock culture หลอดใหม่

(4) หากผลจากการย้อมสีกรัมพบว่าไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่น คือเมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะเป็นท่อนสั้น ติดสีแดงของ safranin จึงนำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ที่เตรียมในข้อ (2) ไปทำการเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(5) นำเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ (4) ทั้ง 2 ขวด มาทำการเจือจางใน Maximum Recovery Diluent (MRD) จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ โดยการทดลองนี้ได้ทำการเจือจางจาก 10^{-1}–10^{-9} โดยก่อนทำการเจือจางใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แต่ละครั้งต้องเขย่าหลอดทดลองด้วยเครื่องเขย่า (Vortex) ให้เชื้อกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

(6) ใช้ปิเปตดูดสารละลายเชื้อจากหลอดทดลองที่ได้ทำการเจือจางและมีความเข้มข้นต่ำที่สุด คือ 10^{-9} จำนวน 1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อพลาสติกไร้เชื้อ ทำจำนวน 2 จาน ต่อ 1 ความเข้มข้น จากนั้นใช้ปิเปตอันเดิมดูดสารละลายเชื้อที่มีความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นอันดับถัดไปก็คือ 10^{-8} และ 10^{-7} ไปจนถึง 10^{-2} โดยทุกความเข้มข้นจะดูดสารละลายเชื้อจำนวน 1 มิลลิลิตร และ ทำจำนวน 2 จานต่อ 1 ความเข้มข้นเช่นกัน

(7) เทอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI Agar ซึ่งได้ฆ่าเชื้อและหลอมเหลวแล้ว (อุณหภูมิไม่เกิน 45 องศาเซลเซียส) ผสมสารละลายของเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้กระจายให้เข้ากันดีโดยการเขย่าไปข้างบนและล่าง 5 ครั้ง เขย่าไปทาง ซ้ายและขวา 5 ครั้ง เขย่าให้หมุนตามเข็มนาฬิกา และทวนเข็มนาฬิกาอย่างละ 5 ครั้ง และในขณะเขย่าควรระมัดระวังไม่ให้อาหารเลอะติดฝาจานเลี้ยงเชื้อ

(8) ปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว ทำการคว่ำจานอาหารเลี้ยงเชื้อลง และ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

(9) นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี นำไปคำนวณหาจำนวนของเชื้อที่มีอยู่ในตัวอย่างเป็น log cfu/ml

3.2.2 การทดลองเพื่อหาช่วงเวลาในการนับการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* Weltevreden DMST 17375 เมื่อเจริญใน BHI broth ที่มีโซเดียมแลกเทต 3 ระดับคือ 0%, 1.2% และ 2.4% ตามลำดับ

3.2.2.1 จำนวนการวางแผนการทดลอง

(1) ทำการวางแผนการทดลองโดยมีระดับปัจจัยดังนี้

โซเดียมแลกเทต 0%, 1.2% และ 2.4% ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงระดับปัจจัยและช่วงเวลาในการตรวจนับเชื้อ

SL0%	SL1.2%	SL2.4%
ช่วงเวลาในการตรวจนับเชื้อ (h)	ช่วงเวลาในการตรวจนับเชื้อ (h)	ช่วงเวลาในการตรวจนับเชื้อ (h)
0	0	0
0.5	0.5	0.5
1	1	1

ตารางที่ 3.1 (ต่อ) ตารางแสดงระดับปัจจัยและช่วงเวลาในการตรวจนับเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

SL0%	SL1.2%	SL2.4%
ช่วงเวลาในการตรวจนับเชื้อ (h)	ช่วงเวลาในการตรวจนับเชื้อ (h)	ช่วงเวลาในการตรวจนับเชื้อ (h)
1.5	1.5	1.5
23	23	23
4	4	4
5	5	5
6	6	6
7	7	7
8	8	8
9	9	9
10	10	10
12	12	11
14	14	12
16	16	14
22	24	16
28	32	17.5
52	51	25
72.5	83.5	32
100	103	55
124	125	78
143	149	101
176.75	172.5	274
195.75	344	438.75
216	508	630
241	702	754
263.5		

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.1 (ต่อ) ตารางแสดงระดับปัจจัยและช่วงเวลาในการตรวจนับเชื้อ

SL0%	SL1.2%	SL2.4%
ช่วงเวลาในการตรวจนับเชื้อ (h)	ช่วงเวลาในการตรวจนับเชื้อ (h)	ช่วงเวลาในการตรวจนับเชื้อ (h)
436.75 600 794		

(2) ในระดับปัจจัยที่โซเดียมแลกเทตเท่ากับ 0%, 1.2% และ 2.4% ตามลำดับ จะทำการวัดเชื้อจำนวน 31, 27 และ 27 ครั้งตามลำดับ แต่ละครั้งทำการทดลอง 2 ซ้ำ ดังนั้นในแต่ละหน่วยทดลองจะมีขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth 62, 54 และ 54 ขวดตามลำดับ และแต่ละระดับจะมีขวดอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับตรวจสอบความปนเปื้อนเพิ่มอีกจำนวน 3 ขวด

3.2.2.2 การเตรียมเชื้อเพื่อเป็นเชื้อตั้งต้นในการทดลอง

(1) นำ stock culture ไปทำการต่อเชื้อ 3 ครั้งโดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1

(2) จากการต่อเชื้อครั้งที่ 3 เลือกโคโลนี 1 โคโลนี โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะ แล้วนำลง BHI broth ที่มีปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จะได้เชื้อประมาณ 10^9 (ร่องรอยของเศษโคโลนีที่เหลือในจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้นำไปย้อมสีกรัม แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าพบว่าลักษณะของเชื้อเป็นรูปร่าง short rod และติดสีกรัมลบทั้งหมด (เชื้อบริสุทธิ์) ก็เลี้ยง broth ต่อไป ถ้าไม่บริสุทธิ์ก็ทำการต่อเชื้อใหม่จาก stock culture หลอดใหม่จนพบว่าเชื้อบริสุทธิ์ก็จะได้ starter culture

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2.3 การนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ

(1) การนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่โซเดียมแลกเทต 0%

1.1) เขย่าขวดอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้น (starter culture) จากข้อ 3.2.2.2 ให้เข้ากันโดยใช้ Vortex แล้วใช้ Autopipette ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ดูดสารละลาย BHI broth ที่มีเชื้อมาจำนวน 1,000 ไมโครลิตร ลงใน MRD ที่มีปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml

1.2) ย้อมสีกรัมเชื้อตั้งต้น (starter culture) จากข้อ 3.2.2 (2) เพื่อตรวจความบริสุทธิ์อีกครั้ง ถ้าไม่บริสุทธิ์ยกเลิกการทดลองในขั้นต่อไป ถ้าบริสุทธิ์ก็ทำการทดลองซึ่งได้เตรียมไว้แล้วในตารางที่ 3.1

1.3) การเตรียมเชื้อเริ่มต้นที่จะใช้เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth โดยทำการเจือจาง MRD จากข้อ 1.1) ที่มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml เขย่าผสมด้วย Vortex แล้วดูดด้วย Autopipette ขนาด 1,000 ไมโครลิตร จำนวน 1,000 ไมโครลิตร ปล่อยลงใน MRD ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำเช่นนี้เรื่อยๆ จนกระทั่งได้ความเข้มข้นตั้งต้นประมาณ 10^4 cfu/ml แล้วนำ MRD ที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 10^4 cfu/ml ลง BHI broth ที่เตรียมไว้แล้วดังตารางที่ 3.1 ซึ่งมีปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำให้สุดท้ายจะได้จำนวนเซลล์ของเชื้อเริ่มต้นในการเลี้ยงมีความเข้มข้นประมาณ 10^3 cfu/ml และ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.4) นำขวดที่ชั่วโมงที่ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 22, 28, 52, 72.5, 100, 124, 143, 176.75, 195.75, 216, 241, 263.5, 436.75, 600 และ 794 ชั่วโมงตามลำดับ มาทำการตรวจนับการเจริญ และเพื่อลดความคลาดเคลื่อนในเรื่องของเวลา ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการเติมเชื้อเป็นขวดสุดท้ายจะนำมาตรวจนับการเจริญของเชื้อ ณ ชั่วโมงที่ 0

การตรวจนับการเจริญ

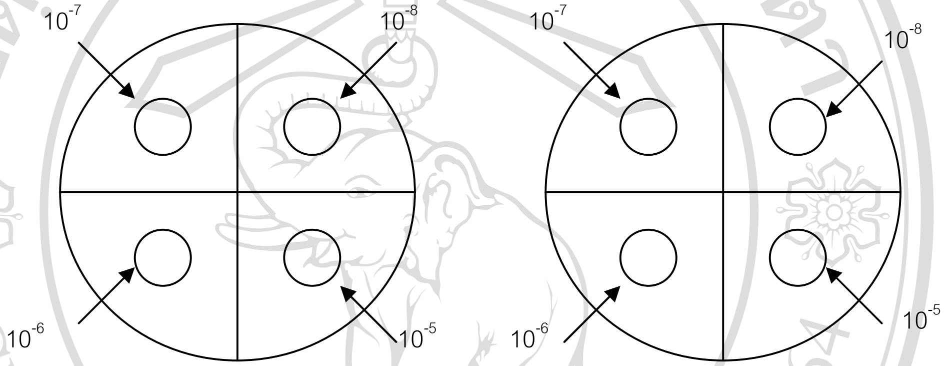
ก) นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากตู้บ่มตามเวลาที่กำหนด เขย่าขวดอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 1.4) ให้เข้ากันโดยใช้ Vortex แล้วใช้ Autopipette ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ดูดสารละลาย BHI broth ที่มีเชื้อมาจำนวน 1,000 ไมโครลิตร ลงใน MRD ที่มีปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าผสมด้วย Vortex แล้วดูดด้วย Autopipette ขนาด 1,000 ไมโครลิตร จำนวน 1,000 ไมโครลิตร ปล่อยลงใน MRD ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำเช่นนี้เรื่อยๆ จนกระทั่งได้ความเข้มข้นที่สามารถนับจำนวนเชื้อได้

ข) แบ่งจานอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ออกเป็น 4 ส่วนด้วยไม้บรรทัดและปากกา permanent

ค) เขย่า MRD จากข้อ ก) ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุดด้วย Vortex แล้วดูดด้วย Autopipette ขนาด 20-200 ไมโครลิตร จำนวน 50 ไมโครลิตร หยด (drop) ลงบนพื้นที่ 1/4 ของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เขย่า MRD ที่ใช้ในข้อ ค) อีกครั้ง แล้วดูดด้วย Autopipette ขนาด 20-200 ไมโครลิตร จำนวน 50 ไมโครลิตร หยด (drop) ลงบนพื้นที่ 1/4 ของจานอาหารเลี้ยงเชื้อตำแหน่งใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ง) เขย่าผสม MRD จากข้อ ก) ที่มีความเข้มข้นของเชื้อถัดมาจากข้อ ค) ด้วย Vortex ทำเช่นเดียวกับข้อ ค) และทำซ้ำเช่นเดียวกันที่ความเข้มข้นของเชื้อใน MRD ถัดมา จนได้ความเข้มข้นจากต่ำไปสูง 4 ลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 ตำแหน่งการหยด MRD ที่มีความเข้มข้นของเชื้อจากต่ำไปสูงจำนวน 4 ความเข้มข้น

จ) ลนห่วงเขี่ยเชื้อด้วยตะเกียงบุนเสน แล้วเกลี่ย (smear) ที่แต่ละความเข้มข้น โดยทำจากความเข้มข้นของเชื้อน้อยไปความเข้มข้นของเชื้อมาก เช่นจากภาพที่ 3.1 ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเกลี่ยบนผิวหน้าของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ ความเข้มข้นที่ 10^{-8} ทั้ง 2 จานอาหารเลี้ยงเชื้อก่อน แล้วจึงเกลี่ยที่ความเข้มข้น 10^{-7}, 10^{-6} และ 10^{-5} ตามลำดับ ด้วยวิธีไร้เชื้อ (aseptic technique) รอจนผิวหน้าอาหารแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อ่านผลเมื่อเวลา 12-24 ชั่วโมง โดยอ่านผล ณ dilution ที่มีจำนวนโคโลนี 5-50 โคโลนี แล้วบันทึกค่าเป็นค่า Viable cell count และคำนวณเป็น log cfu/ml

วิธีคำนวณ log colony from unit (log cfu) / gram or ml

$$\log (N) = \log \left(\frac{\varepsilon C}{V (n_1 + 0.1\, n_2)\, d_1} \right)$$

เมื่อ **N** = จำนวน cfu / g (ml)

V = ปริมาตรของ inoculum (สารละลายเชื้อที่ใช้ตรวจ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

n_1 = จำนวนจานเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นแรก

n_2 = จำนวนจานเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นที่ 2

d_1 = ระดับความเข้มข้นแรก

C = จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่นับได้จากจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมด

(2) การนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่โซเดียมแลกเทต 1.2%

2.1) เขย่าขวดอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้น (starter culture) จากข้อ 3.2.2.2 ให้เข้ากันโดยใช้ Vortex แล้วใช้ Autopipette ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ดูสารละลาย BHI broth ที่มีเชื้อมาจำนวน 1,000 ไมโครลิตร ลงใน MRD ที่มีปริมาตร9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml

2.2) ย้อมสีกรัมเชื้อตั้งต้น (starter culture) จากข้อ 3.2.2 (2) เพื่อตรวจความบริสุทธิ์อีกครั้ง ถ้าไม่บริสุทธิ์ยกเลิกการทดลองในขั้นต่อไป ถ้าบริสุทธิ์ก็ทำการทดลองซึ่งได้เตรียมไว้แล้วในตารางที่ 3.1

2.3) การเตรียมเชื้อเริ่มต้นที่จะใช้เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth โดยทำการเจือจาง MRD จากข้อ 2.1) ที่มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml เขย่าผสมด้วย Vortex แล้วดูดด้วย Autopipette ขนาด 1,000 ไมโครลิตร จำนวน 1,000 ไมโครลิตร ปล่อยลงใน MRD ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำเช่นนี้เรื่อยๆ จนกระทั่งได้ความเข้มข้นตั้งต้นประมาณ 10^4 cfu/ml แล้วนำ MRD ที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 10^4 cfu/ml ลง BHI broth ที่เตรียมไว้แล้วดังตารางที่ 3.1 ซึ่งมีปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำให้สุดท้ายจะได้จำนวนเซลล์ของเชื้อเริ่มต้นในการเลี้ยงมีความเข้มข้นประมาณ 10^3 cfu/ml และ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2.4) นำขวดที่ชั่วโมงที่ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 24, 32, 51, 83.5, 103, 125, 149, 172.5, 344, 508 และ 702 ชั่วโมงตามลำดับ มาทำการตรวจนับการเจริญ และเพื่อลดความคลาดเคลื่อนในเรื่องของเวลา ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการเติมเชื้อเป็นขวดสุดท้ายจะนำมาตรวจนับการเจริญของเชื้อ ณ ชั่วโมงที่ 0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(3) การนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่โซเดียมแลกเทต 2.4%

3.1) เขย่าขวดอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้น (starter culture) จากข้อ 3.2.2.2 ให้เข้ากันโดยใช้ Vortex แล้วใช้ Autopipette ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ดูสารละลาย BHI broth ที่มีเชื้อมาจำนวน 1,000 ไมโครลิตร ลงใน MRD ที่มีปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml

3.2) ย้อมสีกรัมเชื้อตั้งต้น (starter culture) จากข้อ 3.2.2 (2) เพื่อตรวจความบริสุทธิ์อีกครั้ง ถ้าไม่บริสุทธิ์ยกเลิกการทดลองในขั้นต่อไป ถ้าบริสุทธิ์ก็ทำการทดลองซึ่งได้เตรียมไว้แล้วในตารางที่ 3.1

3.3) การเตรียมเชื้อเริ่มต้นที่จะใช้เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth โดยทำการเจือจาง MRD จากข้อ 3.1) ที่มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml เขย่าผสมด้วย Vortex แล้วดูดด้วย Autopipette ขนาด 1,000 ไมโครลิตร จำนวน 1,000 ไมโครลิตร ปล่อยลงใน MRD ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำเช่นนี้เรื่อยๆ จนกระทั่งได้ความเข้มข้นตั้งต้นประมาณ 10^4 cfu/ml แล้วนำ MRD ที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 10^4 cfu/ml ลง BHI broth ที่เตรียมไว้แล้วดังตารางที่ 3.1 ซึ่งมีปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำให้สุดท้ายจะได้จำนวนเซลล์ของเชื้อเริ่มต้นในการเลี้ยงมีความเข้มข้นประมาณ 10^3 cfu/ml และ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.4) นำขวดที่ชั่วโมงที่ 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 17.5, 25, 32, 55, 78, 101, 274, 438.75, 630 และ 754 ชั่วโมงตามลำดับ มาทำการตรวจนับการเจริญ และเพื่อลดความคลาดเคลื่อนในเรื่องของเวลา ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการเติมเชื้อเป็นขวดสุดท้ายจะนำมาตรวจนับการเจริญของเชื้อ ณ ชั่วโมงที่ 0

3.3.การศึกษาการเจริญของเชื้อ *Salmonella* Weltevreden DMST 17375

3.3.1 การศึกษาจำนวนโคโลนีของเชื้อในช่วงระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 22, 24, 26, 30, 198, 366 และ 534 ชั่วโมง (growth curve)

3.3.1.1 การวางแผนการทดลอง

(1) ทำการวางแผนการทดลองแบบ 3^3 Factorial in CRD โดยมีระดับปัจจัยดังนี้

-โซเดียมแลกเทต 0%, 1.2% และ 2.4%

-โซเดียมคลอไรด์ 0%, 2% และ 4%

-สภาวะกรด-เบส (pH) 6.5, 7.0 และ 7.5

ตารางที่ 3.2 ตารางแสดงระดับปัจจัยและลำดับของหน่วยทดลอง

หน่วยทดลองที่ 1	SL 0	NaCl 0	pH6.5
หน่วยทดลองที่ 2	SL 0	NaCl 0	pH7.0
หน่วยทดลองที่ 3	SL 0	NaCl 0	PH7.5
หน่วยทดลองที่ 4	SL 0	NaCl 2	pH 6.5
หน่วยทดลองที่ 5	SL 0	NaCl 2	pH7.0
หน่วยทดลองที่ 6	SL 0	NaCl 2	pH7.5
หน่วยทดลองที่ 7	SL 0	NaCl 4	pH6.5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หน่วยทดลองที่ 8	SL 0	NaCl 4	pH7.0
หน่วยทดลองที่ 9	SL 0	NaCl 4	pH7.5
หน่วยทดลองที่ 10	SL 1.2	NaCl 0	pH6.5
หน่วยทดลองที่ 11	SL 1.2	NaCl 0	pH7.0
หน่วยทดลองที่ 12	SL 1.2	NaCl 0	pH7.5
หน่วยทดลองที่ 13	SL 1.2	NaCl 2	pH6.5
หน่วยทดลองที่ 14	SL 1.2	NaCl 2	pH7.0
หน่วยทดลองที่ 15	SL 1.2	NaCl 2	pH7.5
หน่วยทดลองที่ 16	SL 1.2	NaCl 4	pH6.5
หน่วยทดลองที่ 17	SL 1.2	NaCl 4	pH7.0
หน่วยทดลองที่ 18	SL 1.2	NaCl 4	pH7.5
หน่วยทดลองที่ 19	SL 2.4	NaCl 0	pH6.5
หน่วยทดลองที่ 20	SL 2.4	NaCl 0	pH7.0
หน่วยทดลองที่ 21	SL 2.4	NaCl 0	pH7.5
หน่วยทดลองที่ 22	SL 2.4	NaCl 2	pH6.5
หน่วยทดลองที่ 23	SL 2.4	NaCl 2	pH7.0
หน่วยทดลองที่ 24	SL 2.4	NaCl 2	pH7.5
หน่วยทดลองที่ 25	SL 2.4	NaCl 4	pH6.5
หน่วยทดลองที่ 26	SL 2.4	NaCl 4	pH7.0
หน่วยทดลองที่ 27	SL 2.4	NaCl 4	pH7.5

รวมทั้งสิ้น 27 หน่วยทดลอง

(2) ในแต่ละหน่วยการทดลองจะทำการวัดเชื้อ 18 ครั้ง แต่ละครั้งทำการทดลอง 2 ซ้ำ ดังนั้นในแต่ละหน่วยทดลองจะมีอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth 36 ขวด และทำเพิ่มอีก 14 ขวดเพื่อสำหรับใช้ในการทดสอบหาปริมาตรของกรด HCl หรือ NaOH ให้ได้ pH ซึ่งระบุไว้ในตารางที่ 3.2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.1.2 การเตรียมเชื้อเพื่อเป็นเชื้อตั้งต้นในการทดลอง

(1) นำ stock culture ไปทำการต่อเชื้อ 3 ครั้งโดยใช้วิธีเดียวกับข้อ 3.1.1

(2) จากการต่อเชื้อครั้งที่ 3 เลือกโคโลนี 1 โคโลนี โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อแตะ นำลง BHI broth ที่มีปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จะได้เชื้อประมาณ 10^9 cfu/ml (Angela *et al*., 1988; การทดลองที่ 3.2.1) (ร่องรอยของเศษโคโลนีที่เหลือในจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้นำไปย้อมสีกรัม แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศ์ ถ้าพบว่าลักษณะของเชื้อเป็นรูปร่าง short rod และติดสีกรัมลบทั้งหมด (เชื้อบริสุทธิ์) ก็เลี้ยง broth ต่อไป ถ้าไม่บริสุทธิ์ก็ทำการ sub ใหม่จาก stock culture หลอดใหม่จนพบว่าเชื้อบริสุทธิ์ก็จะได้ starter culture

3.3.1.3 การนับจำนวนโคโลนีของเชื้อในช่วงระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 22, 24, 26, 30, 198, 366 และ 534 ชั่วโมง (growth curve)

(1) เขย่าขวดอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้น (starter culture) จากข้อ 3.3.1.2 (2) ให้เข้ากันโดยใช้ Vortex แล้วใช้ Autopipette ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ดูดสารละลาย BHI broth ที่มีเชื้อมาจำนวน 1,000 ไมโครลิตร ลงใน MRD ที่มีปริมาตร 9 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นเชื้อประมาณ 10^8

(2) ย้อมสีกรัมเชื้อตั้งต้น (starter culture) จากข้อ 3.3.1.2 (2) เพื่อตรวจความบริสุทธิ์อีกครั้ง ถ้าไม่บริสุทธิ์ยกเลิกการทดลองในขั้นต่อไป ถ้าบริสุทธิ์ก็ทำการทดลองซึ่งได้เตรียมไว้แล้วในข้อ 3.3.1.1

(3) เมื่อพบว่า starter culture บริสุทธิ์ นำขวดBHI broth ที่สำหรับใช้ในการทดสอบปรับ pH มาทำการทดลองปรับ pH ให้ได้ตามที่กำหนดไว้ในแต่ละหน่วยทดลองตามตารางที่ 3.2 โดยใช้เครื่อง pH meter ทศนิยม 2 ตำแหน่งเป็นเครื่องวัด ให้อ่านค่า pH ก่อนปรับ บันทึกค่า pH เดิม

(4) ทำการปรับ pH ของ BHI broth ของข้อ (3) ที่จดค่าเดิมไว้แล้วโดยใช้ Autopipette ขนาด 20-200 ไมโครลิตร มาดูดสารละลาย 2N HCl หรือ 2N NaOH อ่านผลและบันทึกค่า pH ทำการปรับ pH จนกระทั่งได้ค่า pH ที่กำหนดไว้ในหน่วยทดลองตามตารางที่ 3.2 พร้อมทั้งบันทึกปริมาตรที่ใช้ปรับ ทำเช่นนี้ 14 ครั้งและเอาค่าปริมาตรของสารละลายที่ทำให้ค่า pH ไม่แตกต่างกันมากกว่า ± 0.02 มาหาค่าเฉลี่ย

(5) การปรับ pH ของ BHI broth ที่มีสารโซเดียมแลกเทตและโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นตามที่กำหนดไว้ในหน่วยทดลองที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.2 โดย เติม 2N HCl หรือ 2N NaOHที่ฆ่าเชื้อแล้วตามปริมาตรที่ได้ทำการทดลองไว้แล้วตามข้อ (4) โดยใช้ Autopipette ขนาด 20-200 ไมโครลิตร เพื่อปรับค่า pH ให้ตรงตามต้องการ ขณะเติมใช้วิธีการไร้เชื้อ (Aseptic technique) ในตู้เขี่ยเชื้อ จนครบทุกขวดอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.3.1.1 (2) แล้วทำการ เขย่าให้เข้ากันโดยใช้ เครื่อง Vortex

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(6) การเตรียมเชื้อเริ่มต้นที่จะใช้เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth จากข้อ (5) โดยทำการเจือจาง MRD จากข้อ (1) ที่มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^8 cfu/ml เขย่าผสมด้วย Vortex แล้วดูดด้วย Autopipette ขนาด 1,000 ไมโครลิตร จำนวน 1,000 ไมโครลิตร ปล่อยลงในMRD ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำเช่นนี้เรื่อยๆ จนกระทั่งได้ความเข้มข้นตั้งต้นประมาณ 10^4 cfu/ml แล้วนำMRD ที่มีความเข้มข้นของเชื้อ 10^4 cfu/ml ลง BHI broth ที่เตรียมไว้แล้วตามข้อ (5) ซึ่งมีปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำให้สุดท้ายจะได้จำนวนเซลล์ของเชื้อเริ่มต้นในการเลี้ยงมีความเข้มข้นประมาณ 10^3 cfu/ml และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

(7) นำขวดที่ชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 22, 24, 26, 30, 198, 366 และ 534 ชั่วโมง ตามลำดับ มาทำการตรวจนับการเจริญ และเพื่อลดความคลาดเคลื่อนในเรื่องของเวลา ขวดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการเติมเชื้อเป็นขวดสุดท้ายจะนำมาตรวจนับการเจริญของเชื้อ ณ ชั่วโมงที่ 0

(8) นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth จากข้อ (7) ไปวัดค่า pH โดยใช้เครื่อง pH meter ทศนิยม 2 ตำแหน่งเป็นเครื่องวัด ทำการอ่านผลและบันทึกค่าทุกครั้งเมื่อทำการตรวจนับการเจริญที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 22, 24, 26, 30, 198, 366 และ 534 ชั่วโมงตามลำดับ

3.3.2 การคำนวณเพื่อหาค่าพารามิเตอร์ A, C, B, M, Generation time, K, D, L และค่า D – Value

3.3.2.1 การคำนวณเพื่อหาค่าพารามิเตอร์ A, C, B และ M

(1) นำค่าที่ได้จากข้อ 3.3.1.3 (7) ไปลงในโปรแกรม LEKSAWASDI RSS MINIMISATION ซึ่งเขียนในโปรแกรม Excel ทำการคำนวณโดยใช้สมการ Gompertz equation เพื่อหาค่าพารามิเตอร์ A, C, B และ M

สมการ Gompertz equation

$$N_t = A + C\,e^{-e^{-B(t-M)}}$$

เมื่อ N_t = log cell population (log cfu/ml)

A = log initial cell population (log cfu/ml)

C = log maximum cell population - log initial cell population (log cfu/ml)

B = growth rate at M (log cfu/ml/h)

M = time, when growth rate reach maximum (h)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2.2 การคำนวณเพื่อหาค่าพารามิเตอร์ Generation time

(1) นำค่าพารามิเตอร์ A, C, B และ M จากข้อ 3.3.2.1 มาคำนวณค่า generation time โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างพารามิเตอร์ B และ C จากสมการ Gompertz equation กับค่า generation time ดังนี้

$$\text{Generation time} = \frac{\log_{10} 2\ (e)}{BxC}$$

เมื่อ C = log maximum cell population - log initial cell population (log cfu/ml)

B = growth rate at M (log cfu/ml/h)

3.3.2.3 การคำนวณเพื่อหาค่าพารามิเตอร์ K, D และ L

(1) นำค่าพารามิเตอร์ A, C, B และ M ที่ได้จากข้อ 3.3.2.1 มาคำนวณหาค่า D, K และ L โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างสมการ Gompertz equation กับพารามิเตอร์การเจริญเติบโต D, K และ L จะได้ค่า Maximum cell population(D), Maximum growth rate(K) และ Lag-phase duration(L) ตามลำดับ

maximum cell population (D) = A+C

maximum growth rate (K) = (BC)/e

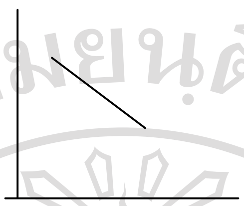
lag-phase duration (L) = M-(1/B)

3.3.2.4 การคำนวณเพื่อหาค่า D-Value

(1) นำค่าจากการนับจำนวนเชื้อเมื่อเชื้ออยู่ในช่วง dead phase มาสร้างกราฟการเจริญในโปรแกรม excel

(2) สร้างสมการถดถอยจากเส้นกราฟ ข้อ (1) โดยมีสูตรคือ Y = - ax+b

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 3.2 ลักษณะการเจริญในช่วง dead phase

(3) คำนวณค่าเวลาที่ทำให้จำนวนเชื้อลดลง 90 % หรือ 1 log cfu/ml จากค่าความชันของกราฟ (a)

3.3.3 การศึกษาระดับปัจจัยที่มีผลต่อค่าพารามิเตอร์ A, C, B, M, Generation time, K, D, L และค่า D – Value

(1) นำค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการคำนวณในข้อ 3.3.2 มาคำนวณแบบ factorial ในโปรแกรม SPSS เพื่อศึกษาระดับของปัจจัยที่มีผลต่อค่า A, C, B, M, Generation time, K, D, L และค่า D – Value

3.3.4 การสร้างสมการความสัมพันธ์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยกับค่าพารามิเตอร์ Generation time, D, K และ L และวิเคราะห์ทวนสอบความถูกต้องของสมการ polynomial equation

(1) นำค่าพารามิเตอร์ Generation time, D, K และ L กับปัจจัยในการทดลองมาหาความสัมพันธ์ โดยโปรแกรม SPSS เพื่อสร้างสมการ polynomial equation ของปัจจัยทั้งหมด ซึ่งจะอยู่ในรูปสมการดังนี้

Model: $Y = a + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_1 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$

(2) ทำการคำนวณค่าพารามิเตอร์ D, K และ L จากสมการที่สร้างขึ้นในข้อ 3.3.4 (1) โดยการแทนค่าจริงของตัวแปรอิสระที่ใช้ในการทดลอง

(3) หาค่า A, C, B และ M จากค่า D, K และ L ที่ได้จากข้อ (2)

(4) ทำการคำนวณจุลินทรีย์ต่อเวลาจากค่า A, C, B และ M ที่คำนวณได้จาก (3) โดยใช้สมการ Gompertz equation

(5) นำค่าจำนวนจุลินทรีย์ ณ เวลาที่ใช้ในการทดลองจริงไปสร้างกราฟ เปรียบเทียบกราฟที่ได้จากการคำนวณกับกราฟที่ได้จากการทดลองจริง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved