บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องมือ (Instruments)

1.1 ตู้แช่เยือกแข็ง (Freezer) ปรับตั้งอุณหภูมิ -20±5 องศาเซลเซียส [Evermed, BLCF245, Sr. 20074517809, Italy]

1.2 ตู้แช่เยือกแข็ง (Freezer) ปรับตั้งอุณหภูมิ -30±5 องศาเซลเซียส [Forma Pharmacy, 3671, Sr. 804888-192, USA]

1.3 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ปรับตั้งอุณหภูมิ 35±1 องศาเซลเซียส [Binder, BD-400, Sr. 03-56745, Germany]

1.4 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ปรับตั้งอุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส [Binder รุ่น BD-400, Sr. 04-70883, Germany]

1.5 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ปรับตั้งอุณหภูมิ 121±1 องศาเซลเซียส [Tomy, ES-315, Sr. 40132036, Japan]

1.6 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) ปรับตั้งอุณหภูมิ 180±10 องศาเซลเซียส [Memmert, UI.E 600, Sr. 603.0593, Germany]

1.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ปรับตั้งอุณหภูมิ 41.5±0.1 องศาเซลเซียส [Memmert, WBU 45, Sr. 1700.0036, Germany]

1.8 เครื่องชั่ง (Balance) 2 ตำแหน่ง [Mettler Toledo, PB 3002-S, Sr. 1126012248, Switzerland]

1.9 เครื่องชั่ง (Balance) 4 ตำแหน่ง [Mettler Toledo, AB 204-S, Sr. 1125521767, Switzerland]

1.10 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow) [Gelaire, BSB 3A, Sr. 10792, Australia]

1.11 เครื่องผสม (Vortex Mixers) [Vortex, 2Genie, Sr. 2-66060, Switzerland]

1.12 ดิจิตอลเทอร์โมมิเตอร์ (Temperature Logger) [3M, TL 20V, Sr. TLAAA62812, USA]

1.13 ตะเกียงบุนเซน (Bunsen Burners)

1.14 เทอร์โมมิเตอร์ชนิดแก้ว (Liquid Glass Thermometer) 3 อัน ช่วงของการวัด 0-100 องศาเซลเซียส ความละเอียด 1 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.15 แม็กซิมัมเทอร์โมมิเตอร์ (Maximum Thermometer) ช่วงของการวัด 0-150 องศาเซลเซียส ความละเอียด 1 องศาเซลเซียส [Brand, Germany]

1.16 ไมโครไปเปต (Micro Pipette) ขนาด 2-20 ไมโครลิตร [Gilson, AK62082, France] ขนาด 20-200 ไมโครลิตร [Gilson, AK57760, France] และขนาด 200-1000 ไมโครลิตร [Gilson, AL60170, France]

2. เครื่องแก้ว (Glassware)

2.1 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ ขนาด 15 x 100 มิลลิเมตร

2.2 หลอดแก้วฝาปิดแบบเกลียว ขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร

2.3 ขวดแก้วฝาปิดแบบเกลียว ขนาด 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร

2.4 ปิเปตแก้ว ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

2.5 กระบอกตวงแบบแก้ว ขนาด 50 และ 100 มิลลิลิตร

2.6 พาสเจอร์ปิเปต

3. วัสดุอุปกรณ์ (Materials)

3.1 ถุงพลาสติกสำหรับเตรียมตัวอย่าง

3.2 ลูปถ่ายเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตร

3.3 ตัวช่วยดูด-จ่ายสาร (Transfer Pipette)

3.4 ทิป ขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร

3.5 ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ (Cotton Swabs)

3.6 หลอดพลาสติก (Eppendorf) ขนาด 2 มิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ (Media) วิธีเตรียมตามภาคผนวก ข

1.1 Baird-Parker Agar; BPA [Oxoid, CM 0275, UK]

1.2 Brain Heart Infusion Broth; BHI [Oxoid, CM 0225, UK]

1.3 Buffered Peptone Water; BPW-ISO [Oxoid, CM 1049, UK]

1.4 I - Lysine Decarboxylation Medium; L-Ly

1.5 MR-VP Medium; MR-VP [Oxoid, CM 0043, UK]

1.6 Nutrient Agar; NA

1.7 Rappaport Vassiliadis Soya Broth; RVS [Oxoid, CM 0866, UK]

1.8 Triple Sugar Iron Agar; TSI [Oxoid, CM 0277, UK]

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.9 Tryptic soy agar; TSA

1.10 10% Sodium Chloride Tryptic Soy Agar; TSA+10% NaCl

1.11 Tryptic Soy Broth; TSB [Oxoid, CM 0129, UK]

1.12 10% Sodium Chloride Tryptic Soy Broth; TSB+10% NaCl

1.13 4% Glycerol Tryptic Soy Broth; TSB+4% Gly

1.14 Tryptone Broth; TB

1.15 Urea Agar; UA

1.16 Xylose Lysine Deoxycholate Agar Base; XLD [Oxoid, CM 0469, UK]

2. สารเคมีและชุดทดสอบเชื้อสำเร็จรูป (Reagents and Test Kit) วิธีเตรียมตามภาคผนวก ค

2.1 API 20E [Biomerieux, REF 20 100, France]

2.2 Agglutination antisera [Clinag, Thailand]

2.2.1 *Salmonella* O Polyvalent OMA-OMG [Clinag, 2004: 5251-5257]

2.2.2 *Salmonella* O Group A-I [Clinag, 2004: 0400-1200]

2.3 Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water; BF

2.4 Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water + Tween 80; BF+TW80

2.5 Coagulase Plasma EDTA [Difco, BDBBL 240827, USA]

2.6 Eggyolk Tellurite Emulsion [Oxoid, SR 0054, UK]

2.7 Ethyl Alcohol 95%

2.8 Ethyl Alcohol 70%

2.9 Gram' s Stain Reagent

2.9.1 Crystal Violet Solution

2.9.2 Gram' s Iodine Solution

2.9.3 Alcohol 95%

2.9.4 Safranin O Solution

2.10 Glycerol 15%

2.11 Kovac's Reagent

2.12 Methyl Red Solution

2.13 ONPG Disc [Oxoid, DD 0013, UK]

2.14 Potassium Iodide Solution

2.15 Tween80

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.16 Voges Proskauer (VP) Reagents

2.16.1 1-Naphthol Ethanolic Solution

2.16.2 Creatine Solution (N-amidinosarcosine)

2.16.3 Potassium Hydroxide Solution

3. น้ำกะทิ

น้ำกะทิที่ใช้ในการทดสอบได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทผลิตภัณฑ์อาหารเชฟช้อย จำกัด ได้จากการคั้นเนื้อมะพร้าวแก่ ด้วยเครื่องคั้นแบบหมุนเกลียว (Screw Pressing) โดยการเติมน้ำที่ควบคุมคุณภาพในอัตราส่วนโดยปริมาตรประมาณ (750:250) จะได้น้ำกะทิที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 75 จากนั้นนำน้ำกะทิเข้มข้นที่ได้มาใส่ในถังให้ความร้อนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน (Homogenization) พร้อมกับการให้ความร้อนที่ระดับพาสเจอไรซ์อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และจากผลการทดสอบคุณค่าทางโภชนาการของน้ำกะทิโดยห้องปฏิบัติการโภชนาการ กลุ่มพัฒนาระบบตรวจสอบคุณภาพสินค้า (กคส.) สำนักพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช (สมพ.) กรมวิชาการเกษตร พบว่าตัวอย่างน้ำกะทิ 100 กรัม มีองค์ประกอบที่สำคัญโดยประมาณ (เฉลี่ย) ดังนี้

ปริมาณไขมัน (Fat) ทั้งหมด	28.28	กรัมต่อ100 กรัม
ปริมาณโปรตีน (Protein)	2.65	กรัมต่อ100 กรัม
ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate)	5.97	กรัมต่อ100 กรัม
ปริมาณเถ้า (Ash) ทั้งหมด	0.72	กรัมต่อ100 กรัม
ปริมาณพลังงาน (Energy) ทั้งหมด	289.00	กิโลแคลอรีต่อ100 กรัม
ปริมาณความชื้น (Moisture)	62.38	กรัมต่อ100 กรัม
ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total Solid)	37.62	กรัมต่อ100 กรัม

4. ไขมันจากน้ำกะทิ (น้ำมันมะพร้าว)

ไขมันจากน้ำกะทิหรือน้ำมันมะพร้าวที่นำมาใช้ในการทดลองจะใช้น้ำมันมะพร้าวธรรมชาติสกัดเย็นกินทรีย์บริสุทธิ์ ยี่ห้อไลฟ์ออยล์ ซึ่งผลิตจากกะทิสดที่อุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส ด้วยเทคโนโลยี Centrifugal Separation โดยการนำน้ำกะทิมาปั่นเหวี่ยงแยกของแข็งและน้ำออกจากชั้นของน้ำมัน โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง จะได้ผลิตภัณฑ์คือชั้นของน้ำมันที่อยู่ด้านบน จากนั้นให้แยกส่วนของน้ำมันมะพร้าวออกและให้นำมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อให้ได้ไขมันที่บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น (ลลิตา อัตนโถ, ม.ป.ป.)

เชื้อมาตรฐานอ้างอิง

1. แหล่งที่มาของเชื้อมาตรฐานอ้างอิง

เชื้อมาตรฐานอ้างอิง (Standard Reference Culture) ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา กคส. สมพ. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานอ้างอิงที่ซื้อมาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จำนวน 2 สายพันธุ์

1.1 *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ ATCC 25923 (DMST 8840)

1.2 *Salmonella* Typhimurium สายพันธุ์ ATCC 13311 (DMST 562)

ในงานวิจัยนี้เลือกใช้ *S.* Typhimurium เป็นตัวแทนของ *Salmonella* เนื่องจาก *S.* Typhimurium เป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคในมนุษย์และมักพบว่ามีการปนเปื้อนในอาหารหลาย ๆ ชนิด สามารถตรวจพบได้ ในพื้นที่เขตร้อนชื้นโดยเฉพาะในประเทศไทย (อรุณ บ่างตระกูลนนท์ และคณะ, 2545)

2. การเตรียมเชื้อมาตรฐานอ้างอิง (ภาคผนวก ง ภาพที่ 8)

2.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น (Stock Culture) ตามคำแนะนำของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ แยกทีเรียทั้งสองสายพันธ์อยู่ในหลอดอาหารกึ่งแข็ง (Semi-Solid Agar) การเตรียมเชื้อมาตรฐานอ้างอิงเพื่อใช้ในการทดสอบ เริ่มจากการเตรียมเชื้อตั้งต้นโดยปิเปตอาหารเหลว TSB ประมาณ 0.3-0.5 มิลลิลิตร (จากหลอดอาหาร TSB 5 มิลลิลิตร) เติมลงในหลอดเชื้อมาตรฐานอ้างอิง ใช้ลูปขูดเชื้อให้กระจายตัว แล้วใช้พาสเจอร์ปิเปต ถ่ายเชื้อกลับมาใส่ในหลอดอาหารเหลว TSB หลอดเดิม นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของแต่ละเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (37 องศาเซลเซียส สำหรับ *S.* Typhimurium และ 35 องศาเซลเซียส สำหรับ *S. aureus*) เมื่อครบเวลาให้นำมาขีดแยกเชื้อบนอาหาร NA และอาหารแข็ง XLD (สำหรับ *S.* Typhimurium) หรืออาหารแข็ง BPA (สำหรับ *S. aureus*) เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และลักษณะโคโลนีที่สำคัญของเชื้อมาตรฐานอ้างอิง นำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีในอาหาร TSI, ONPG, L-Lysine, MR-VP, TB, UA หรือชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20E (สำหรับ *S.* Typhimurium) และทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกูเลส (สำหรับ *S. aureus*) จากนั้นเติมอาหารเหลว TSB ลงในหลอดอาหาร TSB เดิมอีก 5 มิลลิลิตร และบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง ถ้าผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีถูกต้อง ให้นำเชื้อในอาหาร TSB ไปใช้เป็นเชื้อตั้งต้น โดยเติมกลีเซอรอลเข้มข้นร้อยละ 15 (Glycerol 15%) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปในอาหาร TSB เขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอดพลาสติกหลอดละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30±5 องศาเซลเซียส ซึ่งจะมีอายุการใช้งานได้ 1 ปี (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, ม.ป.ป.) ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ให้ตราจบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA และตรวจสอบลักษณะโคโลนีของ *S. aureus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

BPA คือ มีโคโลนีมีสีดำหรือเทา เนื่องจากการรีดิวซ์เทลลูไรท์ที่อยู่ในอาหาร เป็นมันนูน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-1.5 มิลลิเมตร (เมื่อบ่มครบ 24 ชั่วโมง) และ 1.5-2.5 มิลลิเมตร (เมื่อบ่มครบ 48 ชั่วโมง) มีหรือไม่มีวงใสล้อมรอบ และบริเวณที่มีเชื้อเจริญ อาหารจะเกิดตะกอนสีขาวขุ่นรอบโคโลนีเนื่องจากมีกิจกรรมเอ็นไซม์เลซิทิเนส ส่วนลักษณะโคโลนีที่สำคัญของ *S.* Typhimurium บนอาหาร XLD คือ โคโลนีมีสีครีมอมชมพู มีหรือไม่มีสีดำตรงกลางโคโลนี (สีดำที่เกิดขึ้นเนื่องจากการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์) เป็นมันนูน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5-2.5 มิลลิเมตร (เมื่อบ่มครบ 24 ชั่วโมง)

2.2 การเตรียมเชื้อเพื่อใช้งาน (Working Culture)

การเตรียมเชื้อเพื่อใช้งาน ให้ปฏิบัติทุกครั้งเมื่อมีการทดสอบ โดยเตรียมได้จากการนำแบคทีเรียตั้งต้นแต่ละชนิดที่เก็บรักษาไว้ มาขีดแยกเชื้อบนอาหารแข็ง NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (37 องศาเซลเซียส สำหรับ *S.* Typhimurium และ 35 องศาเซลเซียส สำหรับ *S. aureus*) จากนั้นให้ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว BHI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดการเจริญเต็มที่ (ISO, 2000) ทำการเจือจางเชื้อโดยใช้สารละลาย BF เพื่อให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร และตรวจสอบปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้จริงโดยนับจำนวนบนอาหารแข็ง TSA และอาหารอาหารแข็งเฉพาะที่ใช้ในการคัดแยก (XLD สำหรับ *S.* Typhimurium และ TSA+10%NaCl สำหรับ *S. aureus*) โดยใช้เทคนิคการดรอปเพลท เพื่อควบคุมคุณภาพของเชื้อมาตรฐานอ้างอิงก่อนการใช้งานทุกครั้ง สำหรับเชื้อบนอาหารแข็ง NA ให้เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้งานได้นาน 1 เดือน

เทคนิคการนับจำนวนจุลินทรีย์

สำหรับการหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยการนับจำนวนบนอาหารแข็ง (Colony Count) ผู้วิจัยได้เลือกเทคนิคการดรอปเพลทมาใช้ในการทดลอง เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้เป็นการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ทราบค่าเริ่มต้นที่เติมลงในตัวอย่างทดสอบ โดยนับจำนวนที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงทุกการทดลอง และจำนวนตัวอย่างของหน่วยทดสอบมีจำนวนมาก เทคนิคการดรอปเพลทจึงช่วยทำให้เกิดความสะดวกและรวดเร็ว อีกทั้งจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่นับได้ยังเป็นจำนวนที่แท้จริง (Herigstad, Hamilton, & Heersink, 2001) ผู้วิจัยได้ทำการทวนสอบเทคนิคการนับด้วยการดรอปเพลทกับเทคนิคการสเปรดเพลท (Spread Plate) โดยเติมเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงลงในตัวอย่างทดสอบและเปรียบเทียบวิธีการนับโดยใช้เทคนิคทั้งสอง พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ที่นับได้มีค่าใกล้เคียงกันและมีความแตกต่างไม่เกิน 0.1 Log_{10}CFU/ml ในทุกตัวอย่างทดสอบ ดังนั้นจึงสามารถเลือกเทคนิคการดรอปเพลทมาใช้ในการทดลองได้

วิธีการวิจัย

1. ผลของความเข้มข้นของน้ำกะทิต่อการบาดเจ็บและการรอดชีวิตของ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium เมื่อเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็ง

1.1 เตรียมเชื้อเพื่อใช้งานตาม ข้อ 2.2 ของขั้นตอนการเตรียมเชื้อมาตรฐานอ้างอิง โดยให้มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

1.2 เตรียมน้ำกะทิพาสเจอไรซ์ให้มีความเข้มข้น 5 ระดับ โดยน้ำกะทิเริ่มต้นที่ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทผลิตภัณฑ์อาหารเชฟช้อย จำกัด ให้ถือเป็นน้ำกะทิเข้มข้นร้อยละ 75 ส่วนความเข้มข้นของน้ำกะทิอีก 4 ระดับ ให้ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อในการเจือจางโดยให้มีความเข้มข้นของน้ำกะทิลดลงเหลือร้อยละ 65, 55, 45 และ 35 ตามลำดับ

1.3 เตรียมน้ำกะทิแต่ละระดับความเข้มข้นบรรจุในหลอดแก้วแบบฝาเกลียว หลอดละ 10 มิลลิลิตร อย่างน้อยความเข้มข้นละ 30 หลอดและบรรจุในถุงละ 500 กรัม ความเข้มข้นละ 1 ถุง น้ำกะทิทุกระดับความเข้มข้นที่บรรจุในถุงละ 500 กรัม ให้ส่งตรวจวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการที่ห้องปฏิบัติการโภชนาการ กคส.สมพ.กรมวิชาการเกษตร จำนวน 7 รายการ ได้แก่

- ปริมาณไขมันทั้งหมด มีหน่วยเป็น กรัมต่อ100 กรัม
- ปริมาณโปรตีนทั้งหมด มีหน่วยเป็น กรัมต่อ100 กรัม
- ปริมาณคาร์โบไฮเดรต มีหน่วยเป็น กรัมต่อ100 กรัม
- ปริมาณเถ้าทั้งหมด มีหน่วยเป็น กรัมต่อ100 กรัม
- ปริมาณพลังงานทั้งหมด มีหน่วยเป็น กิโลแคลอรีต่อ100 กรัม
- ปริมาณความชื้น มีหน่วยเป็น กรัมต่อ100 กรัม
- ปริมาณของแข็งทั้งหมด มีหน่วยเป็น กรัมต่อ100 กรัม

1.4 เติมแบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้อ 1.1 แต่ละชนิด ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในน้ำกะทิแต่ละระดับความเข้มข้นที่อยู่ในแต่ละหลอด จะได้เชื้อเริ่มต้นในน้ำกะทิประมาณ 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ชุดควบคุมของน้ำกะทิแต่ละระดับความเข้มข้นไม่ต้องเติมเชื้อ)

หมายเหตุ การควบคุมคุณภาพของการทดสอบให้ใช้ TSB+4%GLY ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวก และใช้ TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลลบแทนการใช้น้ำกะทิที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

1.5 นำน้ำกะทิทุกระดับความเข้มข้น และชุดควบคุมคุณภาพของการทดสอบไปแช่เยือกแข็งในตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 5, 10, 15 และ 30 วัน โดยใช้ดิจิตอลเทอร์โมมิเตอร์ในการตรวจติดตามอุณหภูมิที่ใช้ในการแช่เยือกแข็ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.6 เมื่อครบเวลาของการแช่เยือกแข็งให้นำน้ำกะทิแต่ละระดับความเข้มข้นพร้อมชุดควบคุมคุณภาพของการทดสอบมาละลายที่อุณหภูมิห้อง (ใช้เวลาประมาณ 5 นาที) ทำการเจือจางโดยถ่ายตัวอย่างแต่ละชนิด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย BF+Tween80 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม จะได้การเจือจางที่ระดับ 1:10 (10^{-1}) และให้เจือจางต่อด้วยสารละลาย BF+Tween80 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับการเจือจาง 1:100, 1:1,000 และ 1:10,000 (10^{-2}-10^{-4})

1.7 นับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตและบาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็งในน้ำกะทิแต่ละระดับความเข้มข้นและชุดควบคุมคุณภาพการทดสอบ โดยใช้เทคนิคการดรอปเพลท (10 ไมโครลิตร) บนอาหารแข็ง TSA และอาหารเฉพาะที่ใช้ในการคัดแยก และนำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง (*S. aureus* ใช้อาหารแข็ง TSA+10%NaCl บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ส่วน *S.* Typhimurium ใช้อาหารแข็ง XLD บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส) คำนวณหาร้อยละการรอดชีวิตและร้อยละการบาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็ง (แสดงในภาคผนวก ง ภาพที่ 9)

2. ผลของความเข้มข้นของไขมันจากน้ำกะทิต่อการบาดเจ็บและการรอดชีวิตของ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium เมื่อเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็ง

2.1 เตรียมเชื้อเพื่อใช้งาน ตาม ข้อ 2.2 ของขั้นตอนการเตรียมเชื้อมาตรฐานอ้างอิง โดยให้มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

2.2 เตรียมไขมันจากน้ำกะทิ (น้ำมันมะพร้าว) ให้ได้ความเข้มข้น 5 ระดับ โดยทำการเจือจางไขมันจากน้ำกะทิด้วยสารละลาย BF ให้มีความเข้มข้นของไขมันให้สอดคล้องกับระดับความเข้มข้นของไขมันที่ตรวจวิเคราะห์ได้จากน้ำกะทิที่มีเข้มข้นร้อยละ 75, 65, 55, 45 และ 35 ตามลำดับ (จากการทดลองที่ 1)

2.3 บรรจุไขมันจากน้ำกะทิแต่ละระดับความเข้มข้นในหลอดแก้วฝาเกลียว หลอดละ 10 มิลลิลิตร เตรียมอย่างน้อยความเข้มข้นละ 30 หลอด

2.4 เติมแบคทีเรียที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 แต่ละชนิด ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดบรรจุไขมันแต่ละระดับความเข้มข้น จะได้เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (ชุดควบคุมของไขมันแต่ละระดับความเข้มข้นไม่ต้องเติมเชื้อ)

หมายเหตุ การควบคุมคุณภาพของการทดสอบให้ใช้ TSB+4%GLY ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลบวก และใช้ TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นชุดควบคุมที่ให้ผลลบแทนการใช้ไขมันจากน้ำกะทิที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

2.5 นำไขมันจากกะทิทุกระดับความเข้มข้น และชุดควบคุมคุณภาพของการทดสอบไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 5, 10, 15 และ 30 วัน โดยใช้ดิจิตอลเทอร์โมมิเตอร์ในการตรวจติดตามอุณหภูมิที่ใช้ในการแช่เยือกแข็ง

2.6 เมื่อครบเวลาของการแช่เยือกแข็งให้นำไขมันจากกะทิแต่ละระดับความเข้มข้น พร้อมชุดควบคุมคุณภาพของการทดสอบมาละลายที่อุณหภูมิห้อง ทำการเจือจางโดยถ่ายตัวอย่างแต่ละชนิด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย BF+Tween80 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม จะได้การเจือจางที่ระดับ 1:10 (10^{-1}) และให้เจือจางต่อด้วยสารละลาย BF+Tween80 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับการเจือจาง 1:100, 1:1,000 และ 1:10,000 (10^{-2}-10^{-4})

2.7 นับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตและบาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็งในไขมันจากน้ำกะทิแต่ละระดับความเข้มข้นและชุดควบคุมคุณภาพการทดสอบ โดยใช้เทคนิคการดรอปเพลท (10 ไมโครลิตร) บนอาหารแข็ง TSA และอาหารเฉพาะที่ใช้ในการคัดแยก และนำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง (*S. aureus* ใช้อาหารแข็ง TSA+10%NaCl บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส ส่วน *S.* Typhimurium ใช้อาหารแข็ง XLD บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส) คำนวณหาร้อยละการรอดชีวิตและร้อยละการบาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็ง (แสดงในภาคผนวก ง ภาพที่ 10)

3. ผลของอาหารเหลวที่ส่งเสริมการเจริญต่อการฟื้นคืนชีวิตของ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium ที่บาดเจ็บและรอดชีวิตจากการแช่เยือกแข็งน้ำกะทิ

3.1 เตรียมเชื้อเพื่อใช้งานตาม ข้อ 2.2 ของขั้นตอนการเตรียมเชื้อมาตรฐานอ้างอิง โดยให้มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^{6}-10^{7} โคโลนีต่อมิลลิลิตร

3.2 เตรียมน้ำกะทิพาสเจอไรซ์ 3 ระดับความเข้มข้น คือร้อยละ 75, 55 และ 35 ตามลำดับ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุขวดแก้วปลอดเชื้อ ความเข้มข้นละ 24 ขวด

3.3 แบ่งตัวอย่างน้ำกะทิออกเป็น 2 ชุดการทดสอบ

3.3.1 ชุดที่ 1 ให้เติมเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 แต่ละชนิดปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในน้ำกะทิแต่ละขวด จะได้เชื้อในน้ำกะทิเริ่มต้นประมาณ10^{4}-10^{5} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน โดยใช้ดิจิตอลเทอร์โมมิเตอร์ในการตรวจติดตามอุณหภูมิที่ใช้ในการแช่เยือกแข็ง ส่วนกะทิที่ใช้เป็นชุดควบคุมไม่ต้องเติมเชื้อ

3.3.2 ชุดที่ 2 ให้ปฏิบัติเช่นเดียวกับชุดที่ 1 แต่ไม่ต้องนำไปแช่เยือกแข็ง

3.4 นำน้ำกะทิที่เติมเชื้อจากชุดที่ 2 (ข้อ 3.3.2) มาเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ช่วยในการฟื้นคืนชีวิตของเชื้อ 2 ชนิด ชนิดละ 450 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม (ใช้ TSB · 10%NaCl และ TSB บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8, 12,

24 และ 48 ชั่วโมง สำหรับ *S. aureus* ส่วน BPW บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ RVS บ่มที่อุณหภูมิ 41.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ใช้สำหรับ *S.* Typhimurium)

3.5 เมื่อบ่มครบเวลาให้นำน้ำกะทิที่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ส่งเสริมการเจริญ มานับจำนวนเชื้อโดยใช้ BF · Tween80 ในการเจือจาง และใช้เทคนิคการดรอปเพลทบนอาหารแข็ง TSA และอาหารเฉพาะที่ใช้คัดแยก (สำหรับ *S. aureus* ให้ใช้ TSA+10%NaCl ส่วน *S.* Typhimurium ให้ใช้ XLD) นำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง และหาอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific Growth Rate) ของแบคทีเรียทั้งสองชนิด ส่วนกะทิที่ใช้เป็นชุดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ ให้นับจำนวนเชื้อที่อาจปนเปื้อนในน้ำกะทิในขณะที่ทดลองโดยใช้เทคนิคการดรอปเพลท (10 ไมโครลิตร) บนอาหารแข็ง TSA และอาหารเฉพาะที่ใช้คัดแยกเช่นเดียวกันกับชุดทดสอบ

3.6 เมื่อครบกำหนดการแช่เยือกแข็งน้ำกะทิเป็นเวลา 30 วัน (จากข้อ 3.3.1) ให้นำน้ำกะทิจากชุดที่ 1 มาละลายตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องและปฏิบัติเช่นเดียวกันกับน้ำกะทิชุดที่ 2 ตามขั้นตอนที่ 3.4 และ 3.5 (แสดงในภาคผนวก ง ภาพที่ 11)

4. การคำนวณทางสถิติและการแปลผลข้อมูล

4.1 การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของ *S. aureus* และ *S.* Typhimurium ใช้การวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ซึ่งในการศึกษานี้มี 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยแรก คือ ระดับความเข้มข้นของน้ำกะทิ (การทดลองที่ 1) หรือไขมันจากน้ำกะทิ (การทดลองที่ 2) จำนวน 5 ระดับ และปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จำนวน 6 ระดับ (5x6 – 30 Treatments) ทุก Treatment ทดลอง 2 ซ้ำ (30 Treatment x 2 ซ้ำ – 60 หน่วยทดลอง) โดยทุกหน่วยทดลองจะถูกสุ่มอย่างกระจัดกระจายเท่าเทียมกัน และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป IRRI Stat for DOS 1994 (สามารถดาวน์โหลดโปรแกรมได้ที่ http://lookwhatishare.com/irristat.html)

4.2 การคำนวณหาปริมาณเชื้อที่บาดเจ็บจากการแช่เยือกแข็ง สามารถทำได้โดยแปลงค่าจำนวนเชื้อที่นับได้จากหน่วย โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น ค่า Log_{10} ก่อนแล้วจึงคำนวณร้อยละการบาดเจ็บ (% Injury) ของเชื้อจากสูตร (Miller, Brandao, Teixeira, & Silva, 2004; Yamamoto & Harris, 2001)

ร้อยละการบาดเจ็บ (% Injury) = $(A_n - B_n) / A_n \times 100$

โดยที่ A_n = จำนวนเชื้อบนอาหาร TSA ที่เวลาต่าง ๆ

B_i = จำนวนเชื้อบนอาหารเฉพาะที่ใช้คัดแยกที่เวลาต่าง ๆ

4.3 การคำนวณหาปริมาณเชื้อที่รอดชีวิตจากการแช่เยือกแข็ง สามารถทำได้โดยแปลงค่าจำนวนเชื้อที่นับได้จากหน่วย โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็นค่า Log_{10} ก่อนแล้วจึงคำนวณร้อยละการรอดชีวิต (% Total Survival) จากสูตร (Ray & Speck, 1973; Tanaka, Ishino, Matsuba, Takayama, & Ishida, 1999)

ร้อยละการรอดชีวิตของเชื้อ (% Total survival) = $\mathbf{A_n / (A_0) \times 100}$

โดยที่ A_0 = จำนวนเชื้อบนอาหาร TSA ที่เวลา 0 ชั่วโมง

A_n = จำนวนเชื้อบนอาหาร TSA ที่เวลาต่าง ๆ

จากนั้นให้สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำกะทิ (การทดลองที่ 1) หรือไขมันจากน้ำกะทิ (การทดลองที่ 2) กับร้อยละการรอดชีวิตของแบคทีเรียทั้งสองชนิด เมื่อเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน และหาค่า R square (R^2) จากความสัมพันธ์ของกราฟเพื่อสรุปความสัมพันธ์ของผลทดสอบ

4.4 การคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific Growth Rate) ของเชื้อจากการฟื้นคืนชีวิต โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ส่งเสริมการเจริญสามารถทำได้โดยแปลงค่าจำนวนเชื้อที่นับได้จากหน่วย โคโลนีต่อมิลลิลิตร เป็น ค่า Log_{10} และนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อกับเวลาที่ใช้ในการฟื้นคืนชีวิตโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป (Microfit®) (Wilson, n.d.) และสามารถคำนวณหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ และการฟื้นคืนชีวิตได้จากกราฟ เพื่อสรุปผลการเปรียบเทียบการใช้อาหารที่ส่งเสริมการเจริญที่ต่างกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University